UNTERSUCHUNGEN ZUR ANREICHERUNG UND ZUR CHARAKTERISIERUNG ZWEIER LYSOPHOSPHOLIPASEN AUS HUMANSERUM

Ahmed Salem

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0004

UNTERSUCHUNGEN ZUR ANREICHERUNG UND ZUR CHARAKTERISIERUNG ZWEIER LYSOPHOSPHOLIPASEN AUS HUMANSERUM

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Chemie und Phamazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorgelegt
von

Ahmed Salem
aus Kairo (Ägypten)

1979

1. Berichterstatter: Prof.Dr.Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

2. Berichterstatter: Prof.Dr. E.-L. Winnacker

Tag der Einreichung der Arbeit: 26.6.1979

Tag der mündlichen Prüfung : 10.8.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, München, Abteilung für Experimentelle Medizin (Leitung Prof.Dr.Dr. G. Ruhenstroth-Bauer) angefertigt.

Herrn Prof. Dr.Dr. G. Ruhenstroth-Bauer bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker gilt mein Dank für die freundliche Übernahme des zweiten Referates.

Herrn Dr. med. habil. R. Scherer danke ich herzlich für Betreuung und für anregende Diskussionen.

Herzlich möchte ich allen Freunden und Mitarbeitern der Abteilung, insbesondere Herrn W. Strecker und Herrn W. Huber-Friedberg, für Ratschläge und ständige Hilfsbereitschaft danken.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) danke ich sehr herzlich für die finanzielle Unterstützung.

Meiner Frau Azza

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	10
2.1.	Verwendete Geräte	10
2.2.	Verwendete Chemikalien	12
2.3.	Puffer und Lösungen	14
2.4.	Abkürzungen	17
2.5.	Gewinnung von Mischserum	19
2.6.	Gewinnung einer enzymhaltigen Fraktion aus Serum	19
2.6.1.	Ultrazentrifugation	19
2.6.2.	Ammoniumsulfatfällung	20
2.7.	Anionenaustauschchromatographie auf einer DEAE-Sephadex-A-50-Säule	21
2.8.	Osmolarität	22
2.9.	Ultrafiltration	23
2.10.	Dialyse	23
2.11.	Affinitätschromatographie mit der Con-A-Sepharose	24
2.12.	Affinitätschromatographie mit Protein-A-Sepharose	25
2.13.	Immunadsorptionschromatographie	26
2.14.	Chromatographie mit Thiol-Sepharose	28
2.15.	Proteinbestimmung mit dem Nessler-Reagenz	29
2.16.	Immundiffusion nach Ouchterlony	31
2.17.	Herstellung von Substraten	32
2.18.	Dünnschichtchromatographie	36

Seite

2.19.	Phosphorbestimmung nach Fiske-Subbarow	39
2.20.	Gaschromatographische Bestimmung von Fettsäuren	41
2.21.	Bestimmung der Enzymaktivität	42
2.22.	Isoelektrische Fokussierung	49
3.	Ergebnisse	50
3.1.	Quantitative Bestimmung von Fettsäuren	50
3.1.1.	Veresterungsbedingungen	50
3.2.	Gaschromatographische Bestimmung von Fettsäuren	54
3.3.	Nachweis der Lysophospholipase-Aktivität des Humanserums	61
3.4.	Anreicherung der Lysophospholipase-Aktivität des Humanserums	64
3.4.1.	Ultrazentrifugation	64
3.4.2.	Ammoniumsulfatfällung	66
3.4.3.	Anionenaustauschchromatographie auf einer DEAE-Sephadex-A-50-Säule	67
3.4.4.	Affinitätschromatographie auf einer Concanavalin-A-Sepharose-Säule	69
3.4.5.	Immundiffusion nach Ouchterlony	71
3.4.6.	Affinitätschromatographie mit Protein-A-Sepharose	72
3.4.7.	Immunadsorptionschromatographie	74
3.4.8.	Säulenchromatographie mit Thiol-Sepharose	76
3.4.9.	Reinigung einer zweiten enzymatisch aktiven Fraktion aus Humanserum	78
3.4.10.	Immunologische Charakterisierung der zweiten Fraktion aus Humanserum	80

		Seite
3.5.	Reinheit und Homogenität des Enzympräparates LP_1	80
3.6.	Molekulargewichtsbestimmung	82
3.7.	Charakterisierung des Enzympräparates LP_1	83
3.7.1.	Substratspezifität	83
3.7.2.	Fettsäurespezifität	86
3.7.3.	Substratspezifität unter Verwendung verschiedener Puffersysteme	90
3.7.4.	pH-Optimum	92
3.7.5.	Bestimmung der Michaelis-Konstante	94
3.7.6.	Stabilität des Enzyms	98
3.7.7.	Inaktivierung durch Harnstoff	99
3.7.8.	Hitzeinaktivierung	100
3.7.9.	Einfluß von Metall-Ionen und Hemmstoffen	101
3.7.9.1.	Einfluß von Ca^{2+}	101
3.7.9.2.	Einfluß von Mg^{2+}	103
3.7.9.3.	Einfluß von EDTA	104
3.7.9.4.	Einfluß von Hg^{2+} und Cu^{2+}	105
3.7.9.5.	Einfluß von NaCl	106
3.7.9.6.	Einfluß von NaF	107
3.7.9.7.	Einfluß von NaN_3	108
3.7.9.8.	Einfluß einiger organischer Lösungsmittel	109
3.7.9.9.	Einfluß der Detergentien DOC und SDS	110
3.7.9.10.	Einfluß von PCMB	111
3.7.9.11.	Einfluß von DFP	112
3.7.9.12.	Einfluß von Albumin	113
3.7.9.13.	Einfluß von Palmitin- und Ölsäure	113

Seite

3.8.	Einfluß von Neuraminidase	114
3.9.	Einfluß eines Glukokortikoids	115
3.10.	Wirkung des Enzyms auf die Membranphospholipide	116
3.11.	Einige Eigenschaften des zweiten Enzympräparates LP_2	118
3.11.1.	Substratspezifität	118
3.11.2.	pH-Optimum	119
3.11.3.	Stabilität des Enzyms	119
3.11.4.	Einfluß von Metall-Ionen und Hemmstoffen	119
4.	Besprechung	121
5.	Zusammenfassung	135
6.	Literaturverzeichnis	138

1. Einleitung

Die in der Leber synthetisierten Fettsäuren werden dort zum Aufbau von Phosphatiden (vor allem Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin) verwendet, die in Lipoproteine eingebaut und in dieser Form an das Blut abgegeben werden.

Die Phospholglyceride Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidyläthanolamin (PE) stehen im Stoffwechsel in enger Beziehung. Sie sind die wesentlichsten Lipidkomponenten der meisten Membranen tierischer Zellen.

Alle in der Natur vorkommenden Phosphoglyceride lassen sich von dem Glycerol-3-Phosphat Typ ableiten.

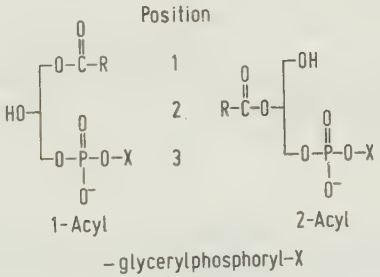

Abb. 1

Phosphoglyceride besitzen vier Esterbindungen: zwei Carboxylesterbindungen in den Positionen 1 und 2, sowie zwei Phosphatesterbindungen (Abb. 1). Davon befindet sich eine an dem hydrophoben Diglycerid-Anteil, während die andere mit der hydrophilen substituierten X-Gruppe gebildet wird.

Durch enzymatische Hydrolyse einer Carboxylesterbindung von Phosphoglyceriden entstehen Lysophosphoglyceride, die nur eine Fettsäure in Position 1 oder 2 enthalten (Abb. 2).

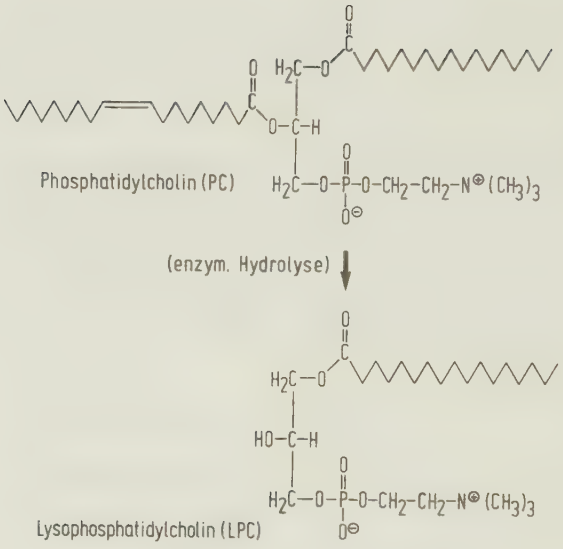

Abb. 2 Umwandlung von PC zu LPC durch Abspaltung einer Carboxylesterbindung an Position 2.

Der enzymatische Abbau von Phosphoglyceriden und Lysophosphoglyceriden erfolgt durch die Wirkung von spezifischen Phospholipasen, die wie ihre Substrate in der Natur weit verbreitet vorkommen.

Viele der in der Literatur beschriebenen Phospholipasen, besonders die intrazellulären, wurden nach ihrer Wirkung auf ein einziges Substrat klassifiziert. Häufig läßt sich jedoch nicht sagen, ob dieses mehr oder weniger willkürlich gewählte Substrat das physiologisch bedeutsamste ist.

Contardi und Ercoli (1) erkannten 1933, daß die verschiedenen Esterbindungen in den Phosphoglyceriden durch verschiedene Enzyme hydrolysiert werden und schlugen daraufhin eine Klassifizierung dieser Enzyme vor. Sie bezeichneten diese als "Lecithasen", da Lecithin das bekannteste Phospholipid war. Heute wird noch häufig der Ausdruck "Lecithinase" verwendet, wenn das Substrat Lecithin (Phosphatidylcholin) ist.

Contardi und Mitarb. (1) schlugen die Bezeichnung "Lecithase A" vor, für Enzyme, die eine der beiden Esterbindungen spalten; "Lecithase B", für Enzyme, die entweder die beiden genannten Bindungen oder die einzige Esterbindung des Lysophosphatides spalten. "Lecithase C" sollte die Cholinphosphat-Bindung angreifen und "Lecithase D" die Diglyceridphosphat-Bindung.

Die derzeitige Klassifizierung geht auf dieses Schema zurück. Es werden jedoch einige Veränderungen eingeführt. In Abb. 3 sind die Angriffspunkte einiger Phospholipasen am Phosphatidylcholin eingezeichnet.

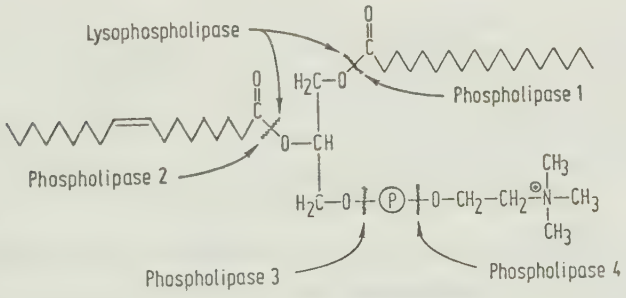

Abb. 3 Angriffsorte der beschriebenen Phospholipasen am Phosphatidmolekül.

Die Phospholipase 2 (EC 3.1.1.4), früher Lecithinase oder Phospholipase A, heute meist noch als Phospholipase A_2 bezeichnet, ist das lipolytische Enzym mit der höchsten Substratspezifität. Die Substratspezifität der Phospholipase 2 variiert stark je nach der Herkunft (2). Demnach können drei große Gruppen der Phospholipase 2 unterschieden werden. In Giften von Schlangen (3,4,5,6), Bienen (7,8) und Skorpionen (9), deren Toxizität zum Teil auf die Wirkung von Phospholipase 2 zurückzuführen ist, wird das Enzym in aktiver Form abgegeben.

Im Pankreas von Mensch, Rind, Schwein und anderen Säugetieren wird Phospholipase 2 als Proenzym produziert und erlangt erst nach Abgabe ins Duodenallumen ihre Wirksamkeit als Verdauungsenzym (10,11,12,13).

In Gewebezellen (14,15,16) und Körperflüssigkeiten (17) von Säugetieren ist Phospholipase 2 ebenso vorhanden wie in verschiedenen Mikroorganismen (18).

Die Phospholipase 1 mit derselben Nomenklatur (EC 3.1.1.4) hadrolysiert die Carboxylesterbindung von Phosphoglyceriden in Position 1. Als Substrat für die Phospholipase 1, wie für die Phospholipase 2, können nur die zweifach mit Fettsäuren veresterten Phosphoglyceridbindungen dienen. Die Phospholipase 1 kommt als intrazelluläres Enzym in verschiedenen Säugetiergeweben (19,20,21) und in Bakterien (22) vor.

Die Phospholipase 3 (EC 3.1.4.3) hydrolysiert Phosphat-Ester-Bindungen in Position 3 von Phosphoglyceriden. Seit 1960 wird sie in der Literatur überwiegend als Phospholipase C bezeichnet.

Die Phospholipase 4 (EC 3.1.4.4), bisher als Phospholipase D geläufig, spaltet die Phosphat-Ester-Bindung in Position 4 von Phosphoglyceriden.

Lysophospholipase (EC 3.1.1.5) hydrolysiert die einzige Carboxylesterbindung von Lysophosphoglyceriden. Lysophospholipasen kommen in Zellen von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen vor. Lysophospholipasen sind möglicherweise spezifisch entweder für Position 1 oder 2 der Lysophosphoglyceride. Jedoch konnte eine derartige Spezifität bis heute nicht eindeutig nachgewiesen werden (23).

Lysophospholipase wurde 1953 zum ersten Mal von Shapiro (24) aus Pnakreas von Rindern gewonnen und charakterisiert. Dieses intrazelluläre Enzym zeigt eine wesentlich geringere Aktivität als Phospholipase 2 und hat für die Verdauung von aufgenommenen Nahrungsstoffen offenbar keine wesentliche Bedeutung. Ähnliche enzymatische Aktivitäten wurden in der Darmmukosa von Ratten (25) und in der Leber (26) gefunden.

In vielen Mikroorganismen wurden Lysophospholipase-Aktivitäten gefunden: Serratia plymuthicum (27); Vibrio El Tor (28); Sclerotinia sclerotiorum (29,30); E.Coli (31,32); Saccharomyces cervisiae (33); Mycobacterium phlei (34); Tetrahymena pyriformis (35); Dictyostelium discoideum (36); Mycoplasma laidlawii (37).

Lysophospholipase wurde auch in Walfleisch (38,39) gefunden, sowie in Kaninchen-Erythrozyten (40), bei der Hausfliege (41), bei Moskitos (42, 43) und interessanterweise auch im Schlangengift (44,45).

Marples und Thompson (46) fanden bei Ratten verhältnismäßig hohe enzymatische Aktivitäten in Dünndarm, Lungen, Milz, Leber und Pankreas; niedrigere Aktivitäten in Nieren, Muskeln, Hoden, Hirn und Blut. Bei Säugetieren wurden die höchsten Lysophospholipase-Aktivitäten in mikrosomalen Fraktionen von Rattenleber (47,48), Hirn (49), Herz (50) und Nebennierenmark (51) gefunden. Andererseits wurden von Lands, Waite und van den Bosch (52,53,54) die höchsten Lysophospholipase-Aktivitäten von Rattenleber im Zytosol gemessen. Subbajah und Ganguly (55) fanden die Enzymaktivitäten in Dünndarmmukosa von Ratten gleichermaßen in Zytosol und in der mikrosomalen Fraktion verteilt.

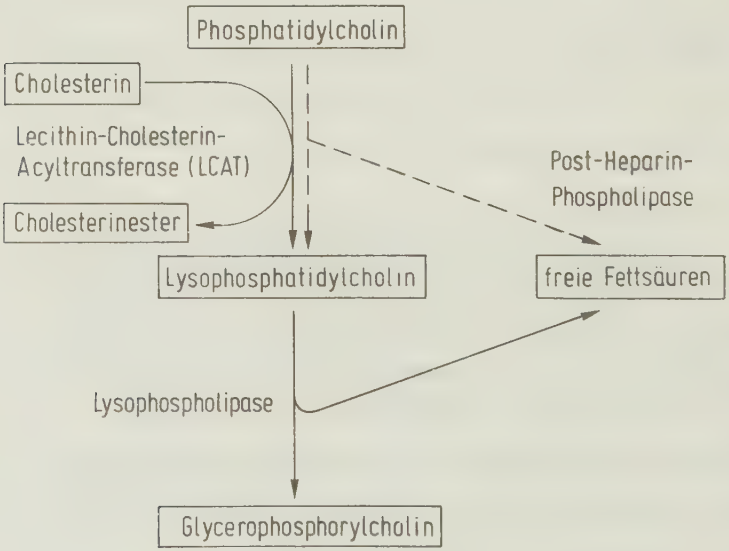

Abb. 4: Schema des enzymatischen Abbaus von Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin in Humanserum.

Das im menschlichen Plasma an die Lipoproteine gebundene Phosphatidylcholin wird fast ausschließlich durch das von Glomset (56) beschriebene Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) abgebaut, wobei die Fettsäure von der C-2 Position des Phosphatidylcholins auf die 3-ß-OH-Gruppen des Cholesterins übertragen und damit die überwiegende Menge der im menschlichen Plasma vorkommenden Cholesterinester gebildet wird. Das als weiteres Reaktionsprodukt verbleibende Lysophosphatidylcholin ist wegen seiner membrantoxischen Wirkungen eine physiologisch hochaktive Stoffklasse. Ebenso bewirkt Post-Heparin Phospholipase die Freisetzung von Lysophosphatidylcholin unter Abspaltung von einer Fettsäure an der Position 1 (Abb. 4).

Von den physiologischen Wirkungen des durch Phosphatidylcholinabbaus im Serum freigesetzten Lysophosphatidylcholins fand der Einfluß dieser Substanz auf die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit besonderes Interesse. Bereits 1936 beobachteten Bergenhem und Fåhraeus, daß menschliches Blutplasma oder Serum, das eine beschleunigte Blutkörperchensenkung (BKS) bewirkt, diese Eigenschaft während mehrstündiger Inkubation bei 37°C verliert (57) und sie deuteten an, daß dieser Effekt durch Lysophosphatide verursacht sein könnte. Später konnte von Schiebel, Adlkofur und Ruhenstroth-Bauer (58,59) nachgewiesen werden, daß die Hemmung der beschleunigten Blutkörperchensenkung durch eine Zunahme der Lysophosphatidylcholin-Konzentration im Serum während der Inkubation bedingt ist.

Untersuchungen von Ruhenstroth-Bauer (60) und Groß (61) ergaben Hinweise, daß die Hemmung der beschleunigten Blutkörperchensenkung (BKS) durch enzymatisch freigesetztes Lysophospatidylcholin bei Patienten mit einem Malignom im statistischen Durchschnitt stärker ausgeprägt ist als bei Patienten mit einer Entzündungskrankheit. Dieses Phänomen konnte von Scherer und Ruhenstroth-Bauer (62) damit erklärt werden, daß bei Patienten mit fortgeschrittenem Malignom ebenso wie bei Patienten mit Leberzirrhose die Syntheseleistung der Leber für das LCAT-Enzym verringert ist und dadurch im Blut enzymatisch weniger Phosphatidylcholin zu Lysophosphatidylcholin abgebaut wird. Es handelt sich somit nicht um ein tumorspezifisches Phänomen.

Ein Ansteigen der Serum-LPC-Konzentration über den physiologischen Bereich führt zur Umwandlung der Erythrozytenform von bikonkaven Scheiben in Kugel- oder Stechapfelform (63,64). Infolge dieser durch den membrantoxischen Effekt von Lysophosphatidylcholin bewirkten Sphärocytose verlieren die Erythrozyten ihre Fähigkeit, Agglomerate in der Art von Geldrollen zu bilden. Da zwischen der Geschwindigkeit der Blutkörperchensenkung und der Größe dieser Agglomerate eine Proportionalität besteht, wird durch den Verlust der Agglomerationsfähigkeit die Sedimentation der Erythrozyten gehemmt.

Durch Erstellung einer Bilanz des Abbaus von Phosphatidylcholin in inkubiertem Humanserum konnte gezeigt werden, daß die Hälfte des durch LCAT-Wirkung entstandenen membrantoxischen Lysophosphatidylcholins durch eine Lysophospholipase unter Freisetzung einer Fettsäure zu Glycerophosphorylcholin, einem nicht lytisch aktiven Bestandteil,

abgebaut wird (65). Somit spielt die Lysophospholipase eine Schutzwirkung gegenüber biologischen Membranen, indem sie eine Anhäufung des membrantoxischen Lysophosphatidylcholin verhindert. Diese Lysophospholipase wurde zum ersten Mal von Hubmann in unserer Arbeitsgruppe (65) nachgewiesen und 65-fach angereichert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Lysophospholipase des Humanserums in höherem Grade anzureichern und zu charakterisieren. Die Anwendung gaschromatographischer Techniken sollten insbesondere zu detaillierten Informationen über die Substrat- und Fettsäurespezifität des Enzyms führen. Desweiteren sollte der Einfluß dieses Enzyms auf die Zellmembranen untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendete Geräte

Amicon-Ultrafiltrationskammern:	Amicon N.V. (Dosterhout, Holland)
Chromatographiesäulen:	LKB-Produkter (Stockholm, Schweden)
Dialyseschläuche (Visking):	Union Carbide Corporation (Chicago, USA)
Elektrophoreseapparatur für Röhrchen:	Eigenbau MPI für Biochemie, Martinsried
Fraktionssammler Ultrarac 7000:	LKB-Produkter (Stockholm, Schweden)
Gaschromatograph Typ 402 (hp):	F&M Scientific division of Hewlett Packard
LKB 12000 Varioperpex Peristatikpumpe:	LKB (Gräfelfing)
LKB 2103 Power Supply:	LKB (Gräfelfing)
LKB 2117 Multiphor-Elektrophoresegerät:	LKB (Gräfelfing)
Lypholisator WKF L2:	Brandau (Darmstadt)
Magnetrührer:	Cenco-Instrumenten (Brede, Niederlande)
Mikroliter-Spritze (100 µl):	C. Hamilton Manufacturing (Bonduz, Schweiz)
Minicon-Ultrafiltrationszellen:	Amicon N.V. (Dosterhout, Holland)
Minifuge 2:	Heraeus-Christ (Osterode/Harz)
Mixer MX-32:	Braun (München)
MSE High Speed 18 Zentrifuge:	Haake (Karlsruhe)

Osmometer:	Knauer (Berlin)
pH-Meter PHM 26:	Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
Rotationsmixgerät (Rotary-Mixer):	Cenco-Instrumenten (Brede, Niederlande)
Rotationsverdampfer (Rotavapor-R):	Flawil,(Schweiz)
Schüttelinkubator:	Köttermann (München)
Spektralphotometer DB:	Beckman Instruments GmbH (München)
Spektralphotometer PMQ 3:	Carl Zeiss (Oberkochen)
Sprühgerät:	Desaga GmbH (Heidelberg)
Titan Rotoren Ti-50 und Ti 70:	Beckman (München)
Trennkammern für Dünnschichtchromatographie:	Desaga GmbH (Heidelberg)
Ultrazentrifuge OMEGA II 70 000:	Heraeus-Christ (Osterode/Harz)
Ultrazentrifuge Spinco L50:	Beckman Instruments GmbH (München)
Uvicord und Punktschreiber:	LKB-Produkter (Stockholm, Schweden)
UV-Lampe:	Original Hanau NV 30/89 Sterisol F 1137 L5, Hanau Quarzlampen (Hanau)
Whirlmixer:	Cenco-Instrumenten (Berde, Niederlande)

2.2. Verwendete Chemikalien

Behringwerke AG, Marburg/Lahn

Agarose; Borsäure Krist; Anti-Human-IgG-Serum; Rinderserumalbumin; Humanserumalbumin

Boehringer GmbH, Mannheim

Phospholipase A_2 aus Crotalus adamanteus für analy. Zwecke; Alkoholdehydrogeanse (Hefe); Alkoholdehydrogenase (Pferdeleber); Katalase (Rinderleber); Neuraminidas (aus Clostridium perfingens); Unveresterte Fettsäuren (Biochemica-Test-Combination)

Carl Roth, Karlsruhe

2-Mercaptoäthanol

Dako-Immunglobulins (Kopenhagen, Dänemark)

Anti-Human-Lambda-light-chains-IgG; Anti-Human-Kappa-light-chains-IgG

Fluka A.G., Buchs SG

N,N-Dimethylformamidimethylacetal

Henkel & Cie GmbH (Düsseldorf)

Palmitinsäure; Stearinsäure; Ölsäure; Linolsäure; Linolensäure; Arachinsäure; Arachidonsäure

K. u. K. Laboratories Ltd (Plainview, N.Y., USA)

Selenoxychlorid

Koch-Light Laboratories Ltd (Colnbrook Bucks England)

Methyl α-D-mannopyranoside

L K B (Gräfelfing)

Ampholine pH 3,5-10; pH 4-6; pH 5-7; pH 9-11

Mann Research Laboratories, Inc. (New York, USA)

Lecithin

Merck, Darmstadt

1-Amino-2-hydroxynaphthalinsulfonsäure-(4); L(+)-Cystein; DC-Fertigplatten Kieselgel ohne Fluoreszenzindikator; 5,5-Diäthylbarbitursäure-Na-Salz; EDTA-Dinatriumsalz (Titriplex III); Kieselsäure (getrocknet; Quecksilber-(II)-chlorid; Harnstoff; Solu-Decortin^{R}-H (Predisolon-21-hemisccinat Natrium); Barbital-Natrium (Natrium-Veronal); Perchlorsäure (etwa 70%);Tris(2-Amino-2-hydroxymethyl-propandiol-1,3)

Merck-Schuchardt (Hohenbrunn

Äthanolamin; Ameisensäureäthylester; Pufferlösung gebrauchsfertig (pH=7)

Nordic Immunological Laboratories (Tilburg, NL)

Anti-Human IgG_I-IgG_4-Seren von Schwein

Nutritional Biochemical Corporation

Lysolecithin, rein

Ölwerke Noury u. Van der Lande GmbH (Emmerich/Rhein)

Sojabohnen

Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Schweden)

DEAE-Sephadex-A-50; Sephadex-G-200-Superfine; Concanavalin-A-Sepharose; Protein-A-Sepharose CL-4B

Serva, Heidelberg

Aldolase (Kaninchenmuskel); Ovalbumin; N,N'-Methylen-bisacrylamid; Acrylamid; Coomassie Brilliant Blue R-250; Saccharose; Säulenfüllung für Gaschromatographie (15% DEGS auf Gaschrom P); Äthylmercuri-thiosalicylsäure Na-Salz (Merthiolat)

Sigma (St. Louis, USA)

p-(Chlomercuri)-benzoesäure Na-Salz, Lysolecithin aus Egglecithin, Bovine Serum Albumin

Whatman, Vetter K.G., Wiesbaden

Whatman Filterpapier Nr. 1

Woelm ICN Pharmaceuticals (Eschwege)

Aluminiumoxid (basisch) Aktivitätsstufe I

Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen und waren von pro Analyse Qualität. Unter der Angabe "Wasser" ist destilliertes Wasser zu verstehen.

2.3. Puffer und Lösungen

Puffer für die DEAE-Sephadex-A-50-Säule

Startpuffer: 0.02 M Phosphatpuffer (pH=7,4)
30.33 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
4.03 g KH_2PO_4
ad 10 L.

Grenzpuffer: 0.2 M Phosphatpuffer, 0.05 M NaCl (pH=7,4)
30.33 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
4.03 g KH_2PO_4
2.92 g NaCl
ad 1 L.

Puffer für die Concanavalin-A-Sepharose-Säule

Puffer I: 0,1 M Acetat, 1 M NaCl, 10^{-3} M $MnCl_2$, 10^{-3} M $MgCl_2$, 10^{-3} M $CaCl_2$ (pH=6,0)

13.600 g Na-Acetat
58.440 g NaCl
0,198 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
0,203 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
0,147 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
ad 1 L, eingestellt auf pH=6,0 mit 4-5 ml 1N-HCl.

Puffer II: Gleiche Zusammensetzung von Puffer I mit zusätzlich 0,1 M Methyl α-D-mannopyranoside

19,40 g Methyl α-D-mannopyranoside
ad 1 L Puffer I

Puffer für die Protein-A-Sepharose-Säule

Puffer I: 0,1 M Phosphatpuffer (pH=7,4)

151,65 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
20,15 g KH_2PO_4
ad 10 L

Puffer II: 0,1 M Glycin-HCl-Puffer (pH=3,0)

6,0823 g Glycin
4,733 g NaCl
190 ml 0,1 N-HCl
ad 1 L

Puffer für die CNBr-aktivierte-Sepharose

Kopplungspuffer: 0,1 M $NaHCO_3$-puffer, 0,5 M NaCl (pH=8,3)

8,401 g $NaHCO_3$
29,22 g NaCl
ad 1 L.

Boratpuffer

0.1 M Boratpuffer, 1 M NaCl (pH=8.0)
34.25 g Borsäure
584.40 g NaCl
277 ml 1N-NaOH
ad 10 L.

Puffer für die Thiol-Sepharose-Säule

Puffer I:

0.02 M Phosphatpuffer, 0.25 M NaCl, 1 mM EDTA (pH=7.1)
21.40 g Na_2HPO_4 wasserfrei
7.80 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$
146.10 g NaCl
3.72 g EDTA
ad 10 L.

Puffer II:

Gleiche Zusammensetzung wie Puffer I mit 10 mM L-Cystein
1.21 g L-Cystein
ad 1 L Puffer I

NaCl/EDTA-Puffer:

0.02 M NaCl/EDTA-Puffer (pH=7.4)
90.0 g NaCl
10.0 g EDTA
ad 10 L, eingestellt auf pH=7.4 mit
24-26 ml 1N-NaOH

Phosphatpuffer:

0.01 M Phosphatpuffer (pH=6.5)
9.75 g KH_2PO_4
5.21 g Na_2HPO_4
ad 10 L.

Phosphatgepufferte physiolg. NaCl-Lösung:

0.01 M Phosphatpuffer (pH= 7.1)
1.07 g Na_2HPO_4 wasserfrei
0.39 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$
8.50 g NaCl

ad 1 L.

2.4. Abkürzungen

Ar	Arachinsäure
Ard	Arachidonsäure
BKS	Blutkörperchensenkung
BSA	Rinderserumalbumin
Con-A	Concanavalin A-Sepharose
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DEGS	Diäthylenglykolsuccinat
DFP	Diisopropylflurophosphat
DOC	Natrium Desoxycholat
FFS	Freie Fettsäure
FS	Fettsäure
g	Erdbeschleunigung
GLS	Gas-Flüssig-Chromatographie
LP_1	Enzymfraktion aus Humanserum
LPC	Lysophosphatidylcholin (Lysolecithin)
LPE	Lysophosphatidyläthanolamin (Lysokephalin)
Lns	Linolensäure
Ls	Linolsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
MS	Methylester
n	Nano
Öl	Ölsäure
P	Pico

PC	Phosphatidylcholin (Lecithin)
PE	Phosphatidyläthanolamin (Kephalin)
pI	Isoelektrischer Punkt
Pls	Palmitoleinsäure
Ps	Palmitinsäure
SD	Standardabweichung
SDS	Dodecylsulfat-Natrium Salz
Sn	Stearinsäure
Soj	Sojabohnen
sp. Ak.	Spezifische Aktivität
s.S.	Siehe Seite
St	Stunde
U	Enzymeinheit
µ	Mikro
UpM	Umdrehungen pro Minute
v	Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
$\bar{X}$	Arithmitisches Mittel

2.5. Gewinnung von Mischserum

Mischserum wurde aus dem Vollblut von klinisch gesunden männlichen Spendern beiderlei Blutgruppen gewonnen. Das Blut wurde durch zehnminütige Zentrifugation (Minifuge) bei 1300 xg in Serum und zelluläre Bestandteile getrennt. Das überstehende Serum wurde aliquottiert und vereint. Stark lipämische Seren wurden verworfen.

2.6. Gewinnung einer enzymhaltigen Fraktion aus Humanserum

2.6.1. Ultrazentrifugation (66,67,68)

Durch Ultrazentrifugation des Serums bei erhöhter Dichte wurden die Gesamtlipoproteine von dem enzymhaltigen Unterstand abgetrennt. Dazu wurde das Humanserum, dessen ursprüngliche Dichte mit 1,006 g/ml angesetzt war (68), mit Kaliumbromid auf eine Dichte von 1,21 g/ml eingestellt. Die zur Dichteeinstellung benötigte Menge (69) von 30,06 g KBr wurde in einen Meßzylinder mit Serum bis zur 100 ml-Marke aufgefüllt. Das eingestellte Serum wurde 36 Stunden bei 328000 xg und bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert (Omega II 70 000, Titan Rotor). Als Ergebnis wurden die Flotationsprodukte in Zentrifugenröhrchen in drei Schichten aufgetrennt: Oben eine homogene gelblich-trübe Schicht mit der Gesamtlipoproteinfraktion, dann eine farblose klare Zwischenzone und einen orange-braunen enzymhaltigen Unterstand.

2.6.1.1. Gewinnung der Gesamtlipoproteinfraktion GLP

Als Gesamtfraktion der Lipoproteine wurden aus jedem Röhrchen jeweils die 0,5 ml der Oberschicht mit einer Spritze vorsichtig abgenommen.

2.6.1.2. Gewinnung der Zwischenzone ZZ

Nach Abhebung der gelben Oberschicht wurde das darauf folgende Volumen von 1 ml verworfen. Die weiße, wasserklare Zwischenzone wurde mit einer Spritze aus jedem Zentrifugenröhrchen entnommen und gesammelt. Nach Einengen mittels Ultrafiltration (s. 2.9.) wurde anschließend gegen Phosphatpuffer (0,02 M; pH=7,4) dialysiert.

2.6.1.3. Gewinnung des enzymhaltigen Überstandes U

Der braune Überstand (~ 5,5 ml) wurde aus den einzelnen Zentrifugenröhrchen gesammelt und gegen Phosphatpuffer (0,02 M; pH=7,4) dialysiert.

2.6.2. Ammoniumsulfatfällung des enzymhaltigen Unterstandes U (70,71)

Das Serum wurde auf einen Ammoniumsulfatsättigungsgrad von 28% eingestellt. Dies erfolgte durch Zugabe einer 90%-igen (3,6 M) Ammoniumsulfatlösung, die mit 25%-igem Ammoniak auf pH=7,4 gebracht worden war. Das Volumen der 3,6 M Ammoniumsulfatlösung, das zum Erreichen einer bestimmten Ammoniumsulfatsättigung zum Mischserum hinzugegeben werden mußte, wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$Y = 100 \cdot \frac{A - B}{C - A},$$

wobei Y das Volumen (in ml) der Ammoniumsulfatlösung der Sättigung C bedeutet, welches zu 100 ml Proteinlösung der Sättigung B gegeben werden soll, um die gewünschte Sättigung A zu erhalten.

Die Zugabe der Ammoniumsulfatlösung erfolgte tropfenweise unter ständigem Rühren bei $4^{o}C$. Nach der Zugabe von Ammoniumsulfatlösung wurde

noch eine Stunde im Kältelabor gerührt und das Serum anschließend durch 20-minütiges Zentrifugieren in der MSE-Zentrifuge bei 4°C und 23 000 xg in Niederschlag und Überstand getrennt. Dieser Überstand wurde auf 55% Ammoniumsulfatsättigung eingestellt und nochmal, wie oben beschrieben, präzipitiert und zentrifugiert. Durch Ammoniumsulfatfällung wurde die enzymhaltige Fraktion U in drei neue Fraktionen geteilt: Die erste Fraktion N_1 enthält die bei einer Ammoniumsulfatkonzentration bis 28% ausgefällten Proteine. Die zweite Fraktion N_2 enthält die bei einer Ammoniumsulfatkonzentration zwischen 28% und 55% ausgefällten Proteine. Die dritte Fraktion N_3 enthält alle bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 55% noch nicht ausgefällten Proteine.

2.7. Anionenaustauschchromatographie der durch Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Enzymfraktion

Die Auftrennung der mittels Ammoniumsulfatfällung gewonnenen enzymhaltigen Fraktion durch DEAE-Sephadex-A-50-Säule erfolgte nach der Methode von Gelotte et al (72,73,74).

DEAE-Sephadex-A-50 wurde in Phosphatpuffer (0,02 M; pH=7) aufgeschwemmt. Man läßt es hierzu zwei Tage bei Zimmertemperatur quellen. Der nach dem Absetzen des Gels überstehende Puffer wird dabei mehrmals abgegossen und durch frischen Puffer ersetzt.

Zur Entfernung von Luftblasen wurde die Suspension 4 Stunden lang in einem Exsikkator evakuiert. Zur Vermeidung von Luftblasenbildung wurde das Sephadex-Gel vorsichtig an einem Glasstab entlang in das Chromatographierohr (Länge 50 cm; Durchmesser 3 cm) gegossen, auf dessen Boden

sich geringe Mengen des Ausgangspuffers befanden. Nach dem Absetzen des Gels wurde die Säule mit dem Startpuffer für einen Tag durchgespült, um das System zu äquilibrieren. Auf die äquilibrierte Säule wurde mittels einer LKB-Pumpe die durch Ammoniumsulfatfällung enzymhaltige Fraktion aufgetragen. Diese Fraktion wurde zuvor gegen den Startpuffer bei 4°C dialysiert. Nach der Auftragung wurde die Säule mit dem Startpuffer durchgespült. Diejenigen Serumproteine, die sich nicht an das Säulenmaterial banden, wurden durch mehrstündiges Abwaschen mit etwa 1 Liter Startpuffer eluiert. Die Durchflußrate betrug 1 ml/min. Die Elution der an das Säulenmaterial gebundenen Komponenten erfolgte durch einen Phosphatpuffergradienten mit kontinuierliche steigender Molarität. Dazu wurde in ein Gefäß mit 450 ml Startpuffer 1 Liter Grenzpuffer geleitet und mittels eines Magnetrührers gemischt.
Der Gradient wurde erst dann angelegt, nachdem alle nicht an den Anionenaustauscher gebundenen Proteine eluiert worden waren. Das Eluat wurde durch einen Fraktionssammler in kleinen Glasröhrchen aufgefangen. Die Extinktion wurde bei 254 nm am Uvicord gemessen und durch einen Schreiber als Kurve aufgezeichnet.

2.8. Bestimmung der Osmolarität

Um die beim kontinuierlich ansteigenden Phosphatpuffergradienten auftretende Ionenstärke zu dokumentieren, wurde von jedem vierten Ausflußröhrchen die Osmolarität mit einem Osmometer gemessen. Das Gerät wurde mit doppeldest. Wasser auf 0 milliosmol und mit einer Eichlösung auf 400 milliosmol geeicht. Mit einer Eppendorf-Pipette wurden jeweils 100 µl des Eluates zur Messung herangezogen.

2.9. Einengen der Proteinlösung durch Ultrafiltration (75)

Größere Volumina der Proteinlösung wurden mittels Amicon-Ultrafiltrationskammer eingeengt. In diese Kammer wurde eine entsprechende Diaflo-Ultrafiltrationsmembran eingelegt, die zuvor mindestens 1 Stunde in einem Becherglas mit dest. Wasser gespült worden war. Nach Verschließen der Ultrafiltrationskammer wurde die Proteinlösung eingegossen. Nach Einschrauben des Ventils und des Druckeinlaßrohres wurde mit Stickstoff ein Druck von 5 at (5 kg/cm^2) angelegt. Um eine gleichmäßige Durchmischung der Lösung zu erreichen, wurde die Kammer auf einen Magnetrührer gestellt. Zur Überprüfung des Filters wurde das Ultrafiltrat in eine 5%-ige Trichloressigsäure geleitet, um etwa ausfließendes Protein infolge eines fehlerhaften Filters zu erkennen. Die eingeengte Proteinlösung wurde mit einer Pasteur-Pipette abgenommen.

Zur Einengung kleiner Volumina von Proteinlösungen dienten Minicon-Ultrafiltrationszellen (B.15. Amicon) mit einem Fassungsvermögen von jeweils 5 ml. Die einzuengende Proteinlösung wurde mit Hilfe einer Pasteur-Pipette in die Minicon-Zelle eingebracht. Nach Erreichen des gewünschten Konzentrationsvolumens wurde die Proteinlösung wieder aus der Minicon-Zelle entnommen.

2.10. Dialyse

Die eingeengten Proteinlösungen wurden in Dialyseschläuche eingefüllt und bei $4^{o}C$ gegen das 100-fache Volumen der zu dialysierenden Menge für 24 Stunden dialysiert. Das Dialysemedium wurde mit Hilfe eines Magnetrührers ständig gerührt.

2.11. Affinitätschromatographie mit der Concanavalin-A-Sepharose

Concanavalin-A-Sepharose besteht aus dem Phytagglutinin Concanavalin-A, das kovalent an Sepharose 4B gebunden ist. Die Con-A-Sepharose dient zur Affinitätschromatographie von Polysacchariden und Glykoproteinen (76,77,78,79,80). Es adsorbiert spezifisch Moleküle mit endständigen α-D-Glucosyl- und α-D-Mannosyl- oder sterisch ähnlichen Gruppen. Serumglykoproteine, die einen gewissen Anteil der genannten Gruppen enthalten, werden an die Con-A-Sepharose gebunden. Durch diese Art von Affinitätschromatographie lassen sich Serumproteine in eine Proteinfraktion mit niedrigem und eine mit hohem Kohlenhydratanteil hinsichtlich der α-D-Glucosyl- und α-D-Mannosyl-Gruppen trennen.

Die Con-A-Sepharose ist ein gebrauchsfertiges Säulenmaterial. Die Pakkung enthält etwa 100 ml gequollenes Gel in 0,1 M Acetatpuffer (pH=6,0) mit 1 M NaCl, 10^{-3} M $CaCl_2$, 10^{-3} M $MgCl_2$, 10^{-3} M $MnCl_2$, sowie 0,02% Merthiolat als Konservierungsmittel.

Die Con-A-Sepharose wurde in ein Säulenrohr (Länge 30 cm; Durchmesser 2 cm) langsam und vorsichtig entlang eines Glasstabes eingegossen. Nach dem Absetzen des Gels ließ man die Säule mit 600 ml Puffer I (s.S. 15) durchspülen, um das Säulenmaterial zu äquilibrieren und gleichzeitig das Konservierungsmittel auszuwaschen. Die Durchflußrate der Con-A-Säule betrug 2,5 ml/min.

Die durch Anionenaustauschchromatographie an der DEAE-Sephadex-A-50-Säule gewonnene enzymhaltige Fraktion wurde zunächst eingeengt und gegen Puffer I dialysiert und dann auf die äquilibrierte Con-A-Sepharose-Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Con-A-Säule mit 800 ml Puffer I durchgespült. Dadurch wurden die nicht an die Säule gebundenen Serumproteine mit niedrigem Kohlenhydratgehalt vollständig eluiert. Dieses Eluat wurde als C_1 bezeichnet. Die Fraktion C_2 mit hohem Glykoproteingehalt wurde

durch Durchspülen der Säule mit 400 ml Puffer II gewonnen. Puffer II wies dieselbe Zusammensetzung wie Puffer I auf, enthielt jedoch zusätzlich 0,1 M Methyl-α-D-mannopyranosid. Dieser Zuckerzusatz bewirkt die kompetitive Verdrängung der gebundenen Glykoproteine vom Säulenmaterial und ermöglicht dadurch die Elution dieser Proteingruppe.

Der Proteingehalt beider Eluate wurde durch Messung der Extinktion am Uvicord bei 254 nm bestimmt und durch ein Schreibgerät als Kurve aufgezeichnet.

2.12. Affinitätschromatographie mit der Protein-A-Sepharose (81,82,83)

Protein-A ist ein Protein, das aus der Zellwand von Staphylococcus aureus isoliert wurde. Protein-A-Sepharose CL-4B, das aus kovalent an Sepharose-CL-4B gebundenem Protein-A besteht, bindet bei entsprechenden Säulenbedingungen die drei IgG-Unterklassen IgG_1, IgG_2 und IgG_4 reversibel. Die nicht an die Säule gebundenen Immunglobuline der Unterklasse IgG_3 erscheinen dabei im ersten Eluat. Die Immunglobuline der Unterklassen IgG_1, IgG_2 und IgG_4 lassen sich durch Änderung der Säulenbedingungen eluieren.

Zur Vorbereitung des Säulenmaterials wurde 1,5 g der friergetrockneten Protein-A-Sepharose-CL-4B in 15 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH=7,1) aufgeschwemmt und für eine Stunde zum Quellen stehengelassen. Die verwendete Menge ergab etwa 5,5 ml gequollenes Gel.

Die Gelsuspension wurde langsam entlang eines Glasstabes in ein Säulenrohr (Länge 15 cm; Durchmesser 1 cm) gegossen. Nach dem Absetzen des Gels wurde die Säule durch Durchlaufen von 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH=7,1) äquilibriert. Die Durchflußrate betrug etwa 1 ml/min.

Auf die äquilibrierte Säule wurde 5 ml der eingeengten und gegen 0,1 M Phosphatpuffer dialysierten Enzymfraktion aufgetragen. Danach wurden die nicht an die Protein-A-Sepharose-Säule gebundenen Immunglobuline der Unterklasse IgG_3 mit 40 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH=7,1) eluiert. Dieses Eluat wurde als P_1 bezeichnet. Anschließend wurde die Säule mit 40 ml 0,1 M Glycin-HCl-Puffer (pH=3,0) durchgespült, wodurch die Fraktion P_2 gewonnen wurde. Diese Fraktion enthielt die reversibel an das Säulenmaterial gebundenen Immunglobuline der Unterklassen IgG_1, IgG_2 und IgG_4.
Der Proteingehalt beider Eluate wurde durch Messung der Extinktion bei 254 nm am Uvicord bestimmt und durch ein Schreibgerät als Kurve dokumentiert.

2.13. Immunadsorptionschromatographie (76,77,84)

Die Immunadsorptionschromatographie stellt eine Art der Affinitätschromatographie dar, bei der kovalent an das Säulenmaterial gebundene spezifische Antikörper und korrespondierende antigene Proteine als immunologische Reaktionspartner wirken.
Durch Kopplung von Anti-Human-kappa-L-Ketten-Gammglobulin und Anti-Human-lambda-L-Ketten-Gammaglobulin an CNBr-aktivierte Sepharose wurde eine Chromatographiesäule hergestellt, die es ermöglicht, Human-Immunglobuline spezifisch zu adsorbieren und dadurch von anderen Proteinen der enzymhaltigen Fraktion zu trennen.
Zur Vorbereitung des Säulenmaterials wurden 15 g friergetrocknete CNBr-aktivierte Sepharose-4B mit 10^{-3} M HCl-Lösung über einem Glasfilter zum Quellen gebracht, wobei 1 g Sepharose ein Gelvolumen von etwa 3,5 ml ergab. Anschließend wurde das Gel mit insgesamt 3 L der 10^{-3} M HCl-Lösung gewaschen. Die nach der Waschung überschüssige Salzsäurelösung

wurde durch Vakuum abgesaugt, bis das Gel zwar noch feucht, aber nicht mehr flüssig war. Das Gel wurde dann von der Glasfritte in ein Becherglas überführt. 5 ml Anti-Human-Kappa-L-Ketten-Gammaglobulin und 5 ml Anti-Human-Lambda-L-Ketten-Gammaglobulin, die gegen den Kopplungspuffer dialysiert und mit demselben Puffer auf ein Gesamtvolumen von 20 ml verdünnt worden waren, wurden dem Sepharose-Gel beigemischt. Anschließend wurde die Gel-Suspension in Glasröhrchen gefüllt, mit Schliffstopfen verschlossen und mit Klebstreifen gegen Öffnen gesichert. Die Kopplung der Gammaglobuline an die CNBr-aktivierte Sepharose-4B erfolgte binnen zwei Stunden bei Zimmertemperatur unter Verwendung eines Rotationsmixgerätes. Zur Entfernung von nicht gebundenen Anti-L-Ketten-Gammaglobulin wurde das Gel erneut auf die Glasfritte gegeben und mit 3 L Kopplungspuffer gewaschen. Daraufhin wurde das Gel mit 1 M Äthanolamin-Lösung (pH=8,0) im Becherglas für 2 Stunden behandelt, um verbliebene reaktive Gruppen der Sepharose zu blockieren. Danach wurde das Gel mit 2 L Acetatpuffer und anschließend mit 2 L Boratpuffer (0,1 M; pH=8,0) gewaschen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Zum Schluß erfolgte eine Waschung mit 3 L NaCl-Phosphatpuffer (pH=7,4).

Die Gel-Suspension wurde langsam und vorsichtig in ein Glasrohr (Länge 30 cm; Durchmesser 1,4 cm) gegossen. Zu Äquilibrierung wurde die Säule mit NaCl-Phosphatpuffer (pH=7,4) durchgewaschen. Die Durchflußrate der Säule betrug etwa 1 ml/min.

Die aufzutrennende Proteinlösung wurde gegen NaCl-Phosphatlösung dialysiert, auf 1 ml eingeengt und anschließend auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Mit 100 ml NaCl-Phosphatpuffer wurden die nicht an die Säule gebundenen Proteine eluiert. Die gewonnene Fraktion wurde als LP_1 bezeichnet. Die Elution der an das Säulenmaterial gebundenen Immunglobuline wurde mit 0,1 M Glycin-HCl-Puffer (pH=3,0) und mit 0,1 M Essigsäure (pH=2,9) versucht.

2.14. Chromatographie mit aktivierter Thiol-Sepharose (85)

Mittels einer aktivierten Thiol-Sepharose-Säule lassen sich Proteine, die Thiolgruppen enthalten, von Proteinen ohne Thiolgruppen trennen. Die in Lösung vorhandenen SH-Gruppen-haltigen Proteine reagieren mit stationären aktiven Gruppen der Thiol-Sepharose, indem sie unter Bildung von gemischten Disulfiden dort kovalent gebunden werden. Im Anschluß an die Elution der nicht an das Säulenmaterial gebundenen Proteine, können die kovalent gebundenen Proteine durch Zugabe eines Reduktionsmittles eluiert werden.

Zur Vorbereitung des Säulenmaterials ließ man 10 g der friergetrockneten aktivierten Thiol-Sepharose-4B in Startpuffer (s.S. 16) quellen, wobei 1 g Thiol-Sepharose ein Gelvolumen von etwa 4 ml ergab. Zur Entfernung von Stabilisationszusätzen wurde das Gel mit 2 L Startpuffer gewaschen. Die gewaschene Gel-Suspension wurde in ein Säulenrohr (Länge 30 cm; Durchmesser 1,4 cm) gegossen. Nach dem Absetzen des Gels wurde die Säule mit 200 ml Startpuffer durchgespült. Die Durchflußgeschwindigkeit der Säule betrug 1 ml/min.

Die aufzutrennende enzymhaltige Fraktion wurde eingeengt, gegen Startpuffer dialysiert und anschließend auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Die nicht an die Thiol-Sepharose gebundenen Proteine wurden mit 120 ml Startpuffer eluiert. Die dadurch erhaltene Fraktion wurde als T_1 bezeichnet. Anschließend erfolgte die Elution der an das Säulenmaterial gebundenen SH-Gruppen-haltigen Proteine durch 200 ml Reduktionspuffer (s.S. 16). Diese Fraktion wurde als T_2 bezeichnet.

2.15. Proteinbestimmung mit dem Nessler-Reagens (86,87)

Nessler's Reagens, die alkalische Lösung von Kalium [tetrajodomercurat(II)]($K_2(HgJ_4)$, bildet mit Ammoniak einen orangefarbenen Komplex, wodurch die Ermittlung des Proteingehaltes durch Bestimmung des Ammoniumstickstoffs ermöglichtwird.

2.15.1. Herstellung des Nessler's Reagens

60 g Quecksilber-(II)-Chlorid wurden unter Erwärmen in 500 ml dest. Wasser gelöst und 74 g Kaliumjodid, aufgelöst in 500 ml dest. Wasser, hinzugegeben. Der entstehende rote Niederschlag von Quecksilber-(II)-jodid wurde nach Dekantieren des Überstandes dreimal mit dest. Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 65 bis 70 g Kaliumjodid, bis der Niederschlag gerade gelöst und die Lösung klar war. Mit dest. Wasser wurde die Lösung auf 500 ml aufgefüllt und nach Hinzufügen von 500 ml 5N-Natronlauge durchgemischt. Die Lösung wurde im Dunkeln aufbewahrt.

2.15.2. Veraschung

Die Zubereitung der Veraschungsmixtur erfolgte, indem 4 g wasserfries Natriumsulfat in 25 ml dest. Wasser gelöst, 0,2 ml Selenoxychlorid zugegeben und nach Durchmischung 25 ml Schwefelsäure hinzugefügt wurden. Vor der Veraschung wurden proteinreiche Serumfraktionen auf 1/10 ihres Proteingehaltes verdünnt, so daß 1 ml Proteinlösung etwa 5 mg Protein enthielt. 0,1 ml der zu bestimmenden Proteinlösung wurden in hohen, dickwandigen Reagenzgläsern mit 0,2 ml Veraschungsmixtur versetzt und

bei 310°C im Aluminiumblock verascht, bis alle Proben vollständig entfärbt waren.

2.15.3. Verdünnung

Nach dem Abkühlen der Reagenzgläser wurden zu den Proben, deren Volumen am Ende der Veraschung nur noch 0.1 ml betrug, 5 ml dest. Wasser hinzugegeben.

2.15.4. Nesslerisieren

In ein Reagenzglas wurde 0.5 ml von der verdünnten Probe übergeführt und 1.5 ml dest. Wasser dazupipettiert. Nach Zugabe von 1 ml Nessler's Reagenz und Durchmischung der Probe erfolgte 30 Minuten später die Messung der Extinktion im Spektralphotometer bei 440 nm.
Zur Quantifizierung der Ergebnisse dient eine Ammoniumsulfat-Standardlösung (47.2 mg Ammoniumsulfat + 100 ml konzentrierte Schwefelsäure + bidest. Wasser ad 100 ml).
Proben von 50 µl, 100 µl und 150 µl, die entsprechend 5µg, 10µg und 15µg Stickstoff enthielten, wurden mit dest. Wasser auf je 2 ml aufgefüllt und mit 1 ml Nessler's Reagenz versetzt.
Als Blindwert dienten Proben von 2 ml 0.5%-iger Schwefelsäure nach Zugabe von 1 ml Nessler's Reagenz.

2.15.5. Berechnung des Proteingehaltes

Aus den Extinktionswerten der drei Standardproben wurde ein Faktor "A" nach folgender Formel errechnet :

$$A = \frac{E_{440} \times 100}{\mu g\ N}$$

Stickstoffgehalt im veraschten Volumen der Proteinlösung:

$$\mu g\ N/\text{veraschtes Volumen} = \frac{E_{440} \cdot 1000}{A} \times \frac{\text{Totalvolumen der Verdünnung (ml)}}{\text{Volumen der nesslerisierten Probe (ml)}}$$

Proteingehalt/ml der veraschten Proteinlösung =

$$\frac{\text{mg Protein}}{\text{ml}} = 6{,}25 \times \frac{\mu g\ N\ /\ \text{veraschtes Volumen}}{\text{Volumen der veraschten Probenlösung } (\mu l)}$$

2.16. Immundiffusion nach Ouchterlony

Zur immunologischen Charakterisierung der angereicherten Enzymfraktion wurde die Geldiffusion nach Ouchterlony (88,89) herangezogen.
Zur Herstellung der Gel-Platten wurde zunächst 0,5 g Agarose in 25 ml bidest. Wasser bei einer Temperatur von 100°C gelöst. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 25 ml Ouchterlony-Puffer. Auf eine exakt waagerecht liegende Glasplatte wurde die heiße, flüssige Agarose-Lösung gegossen. Nach 30 minütiger Verfestigung wurden aus dem Agarose-Gel Löcher ausgestanzt. Zur Identifizierung der Serumproteine der Enzymfraktion wurde das zentrale Loch mit dem jeweiligen Antiserum gefüllt, während in die umgebenden Löcher verschiedene Mengen der auszutestenden Enzymfraktion pipettiert wurden. Anschließend wurde die Platte 30 Stunden lang in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Nach diesem Vorgang wurde die Platte mit mehreren Lagen Filterpapier bedeckt und unter leichtem Druck 30 Minuten lang gepreßt. ZUr Entfernung von nicht präzipitierten Proteinen wurde die Platte 1 Stunde lang in 0,9%-iger Kochsalzlösung gewaschen. Dann wurde die Platte für 10 Minuten in dest. Wasser gewässert und anschließend in heißer

Luft (Föhn) getrocknet. In 0,5%-ige Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung wurde die Platte über Nacht gefärbt. Zum Entfärben des Untergrundes, das bis zu mehreren Tagen dauerte, wurde eine Lösung aus Äthanol, dest. Wasser und Eisessig (45:45:10 v/v) verwendet.

2.17. Herstellung von Substraten

Als Substrate wurden Phosphoglyceride und Lysophosphoglyceride sowohl aus Sojabohnen als auch aus Humanserum hergestellt. Die Reinheit der gewonnenen Präparationen wurde mittels Dünnschichtchromatographie (s. 2.18) überprüft. Die quantitative Bestimmung von Phosphoglyceriden und Lysophosphoglyceriden erfolgte durch Bestimmung des Phosphorgehaltes der hochgereinigten Präparationen.

2.17.1. Extraktion der gesamten Sojabohnenlipide

Lufttrockene Sojabohnen (30 g) wurden in einem 1-Liter-Becherglas, dessen Boden mit feuchtem Zellstoff belegt war, einschichtig ausgebreitet und mit einer Lage feuchtem Zellstoff bedeckt. Die Sojabohnen wurden zur Keimung in einen Brutschrank mit der optimalen Keimtemperatur von 37^{o}C gebracht. Die Keimung der Sojabohnen erfolgte während 40 Stunden unter gleichmäßiger Befeuchtung. Die gekeimten Sojabohnen wurden unter Zugabe von 500 ml Methanol in einem Mixgerät homogenisiert. Das Sojabohnenhomogenat wurde in einen 2-Liter-Erlenmeyerkolben überführt und 500 ml Chloroform hinzugefügt. Nach zweistündigem Rühren bei Zimmertemperatur wurde die flüssige Phase dieser Suspension durch Saugfiltration gewonnen und anschließend am Rotationsverdampfer zum Trocknen gebracht.

2.17.2. Auftrennung des Lipidrohextraktes in einen phosphatidyläthanolaminhaltigen und einen phospahtidylcholinhaltigen Anteil durch eine Aluminiumoxid-Säule nach Rhodes und Lea (95)

80 g Aluminiumoxid wurden mit Chloroform:Methanol (1:1 v/v) vermischt. Nach dem Absetzen wurde die trübe Oberphase sooft dekantiert, bis sie einigermaßen klar war. Anschließend wurde die Suspension in eine Glassäule gefüllt und die gepackte Säule (Länge 20 cm; Durchmesser 2 cm) mit Chloroform:Methanol (1:1 v/v) durchgespült. Auf diese Säule wurde der in 20 ml Chloroform:Methanol (1:1 v/v) gelöste Lipidextrakt aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 750 ml Chloroform:Methanol (1:1 v/v) eluiert. Dieses Eluat enthielt fast den gesamten Phosphatidylcholinanteil sowie den Hauptanteil der Fettsäuren, Triglyceride und Sterine des Lipidextraktes. Danach erfolgte die Gewinnung des phosphatidyläthanolaminhaltigen Anteils, indem die Säule mit 800 ml Chloroform: Methanol:Wasser (2:4:1 v/v) durchgespült wurde. Dieses zweite Eluat der Aluminiumoxidsäule enthielt den Großteil des Phosphatidyläthanolamins neben geringen Mengen von Phosphatidylcholin, Fettsäuren, Triglyceriden und Sterinen.

2.17.3. Reinigung der Phosphatidylcholinfraktion durch eine Siliciumoxid-Silicat-Säule nach Rouser (96)

50 g Kieselsäure wurde mit dem Chloroform:Methanol (1:1 v/v) versetzt, so daß sich gerade eine leicht flüssige Mischung ergab, der 7 ml 25%-iger Ammoniak zugesetzt wurden. Das Säulenmaterial wurde in ein Glasrohr gegossen. Die gepackte Säule (Länge 20 cm; Durchmesser 2 cm) wurde mit etwa 500 ml Chloroform durchgewaschen. Anschließend wurde die in 20 ml Chloroform gelöste Rohphosphatidylcholinfraktion auf die Kieselsäuresäule aufgetragen. Zur Elution der Fettsäuren, Triglyceride und Sterine wurde die Säule mit 600 ml Chloroform durchgespült.

Das an die Säule gebundene Phosphatidylcholin wurde anschließend mit 750 ml Chloroform:Methanol:Wasser (80:20:1,5 v/v) eluiert.
Die Reinheit des Eluats wurde durch Dünnschichtchromatographie überprüft. Das erhaltene gereinigte Phosphatidylcholin wurde in zwei Teile geteilt, von denen der eine als Phosphatidylcholin aufbewahrt wurde, der andere zur Gewinnung des Lysophosphatidylcholins verwendet.

2.17.4. Reinigung der phosphatidyläthanolamin-haltigen Fraktion durch Dünnschichtchromatographie

Die Fraktion, die die Phosphatidyläthanolamine in Rohform enthielt, wurde am Rotationsverdampfer zum Trocknen gebracht. Der verbliebene Lipidrückstand wurde in 5 ml Chloroform:Methanol (2:1 v/v) gelöst. Davon wurden jeweils 0,5 ml auf eine Kieselgel-Dünnschichtplatte (20 cm x 20 cm, Schichtdicke 0,5 cm) aufgetragen. Man trägt auf dieselbe Platte eine Kephalin-Standard-Lösung in gleicher Höhe auf. Die Auftrennung der Lipide erfolgte durch Ein-Stufen-Chromatographie (s. 2.18.2.) über die volle Höhe der Platte mit dem Laufmittel Chloroform: Methanol:Wasser:Eisessig (56:24:3,5:0,5 v/v). Die Bande des Kephalin-Standards und die Banden eines kleinen Teils des aufgetragenen Rohkephalinextraktes wurden durch Jodierung angefärbt. Anschließend wurde die Lokalisation des nicht angefärbten Teils des Sojabohnen-Phosphatidyläthanolamins auf der Platte markiert. Dieser Teil wurde ausgekratzt, in Extraktionsfläschchen überführt und mit Chloroform:Methanol:Wasser (2:4:1) aus dem Kieselgel eluiert. Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand filtriert, durch Rotationsverdampfung zum Trocknen gebracht und anschließend der Rückstand in Chloroform:Methanol (2:1 v/v) aufgelöst. Das erhaltene gereinigte Cholamin-Kephalin wurde in zwei Anteile geteilt, wovon der eine als Phosphatidyläthanolamin aufbewahrt wurde, der andere jedoch zu Lysophosphatidyläthanolamin abgebaut wurde.

2.17.5. Abbau von Phosphatidylcholin zu Lysophosphatidylcholin und von Phosphatidyläthanolamin zu Lysophosphatidyläthanolamin

Die Spaltung des Phosphatidylcholins zu Lysophosphatidylcholin erfolgte durch die Wirkung der Phospholipase A_2 aus dem Gift von Crotalus adamanteus (97,98). Die Sojabohnen-Phosphoglyceride (Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin) wurden in je 10 ml Diäthyläther gelöst. Dazu wurden jeweils 0,2 ml Phospholipase A_2-Lösung und 0,1 ml 1N-$CaCl_2$-Lösung gegeben. Nach Verschluß des Schliffglases mit Stopfen wurde intensiv gemischt, der Stopfen mit einem Klebeband sicher fixiert und der Ansatz bei Zimmertemperatur für 18 Stunden mittels eines Rotationsmixgerätes laufend durchgemischt. Zur Darstellung der entstandenen Lysophosphoglyceride wurde zunächst der Äther am Rotationsverdampfer entfernt, wodurch ein visköser Rückstand verbleibt, welcher einer zweimaligen Lipidextraktion mit je 20 ml Chloroform:Methanol (2:1 v/v) unterzogen wird. Nach dem Abdampfen der organischen Lösungsmittel erfolgte die Darstellung der Lysophosphoglyceride mittels einer Acetonfällung. Hierzu wurde der Niederschlag in 1 ml Chloroform gelöst und daraufhin mit 30 ml eisgekühltem Aceton kräftig geschüttelt. Durch 10-minütiges Abzentrifugieren setzen sich die ausgefällten Lysophosphoglyceride als weißer Niederschlag auf dem Boden des Glases ab. Anschließend wurde der klare Überstand dekantiert. Die Reinheit der durch Acetonfällung ausgefällten Lysophosphatide wurde mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt (Abb. 5).

2.17.6. Herstellung von Phosphoglyceriden und Lysophosphoglyceriden aus Serum

In einem 2-Liter-Erlenmeyerkolben wurden 100 ml Humanserum überführt. Dazu wurden 750 ml Chloroform:Methanol (1:1 v/v) tropfenweise durch

einen Scheidetrichter gegeben und kräftig geschüttelt. Die Serumsuspension wurde 2 Stunden nach Zugabe von Chloroform:Methanol bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und durch Rotationsverdampfung eingeengt.
Dieser Rohextrakt wurde mittels einer Aluminiumoxid-Säule (95) und einer Siliciumoxid-Silicat-Säule (96), wie bereits beschrieben, weiter bearbeitet, um Phosphatidylcholin zu gewinnen. Ein Teil dieses Präparates wurde mit Hilfe der Phospholipase A_2 aus Crotalus adamanteus ins Lysophosphatidylcholin umgewandelt. Die Reinheit beider Präparate wurde durch Dünnschichtchromatographie geprüft.

2.18. Dünnschichtchromatographie der Sojabohnen- und Serumlipide (99,100)

Die Auftrennung der Lipidextrakte aus den Ansätzen erfolgte durch Dünnschichtchromatographie auf DC-Fertigplatten-Kieselgel (20 cm x 20 cm, Schichtdecke 0,25 cm). Die Lipidextrakte wurden in bestimmten Volumina Chloroform:Methanol (2:1 v/v) gelöst. Mit einer Hamilton-Spritze wurden davon 100 µl in das Auftragegerät eingebracht und die Lipidlösung mit Hilfe eines automatisch dosierenden Spritzenvorschubes auf die Kieselgelplatte aufgetragen. Die Auftragung einer Probe erfolgte bandförmig über eine Breite von 2,5 cm. Ein Kaltföhn -im Abstand von ca. 40 cm seitlich oberhalb der Platte befestigt- beschleunigte das Trocknen der Auftragstelle. Etwa eine Stunde nach der Auftragung wurden die Platten in eine Trennkammer gebracht, die mit dem Laufmittel (84 ml) mindestens zwei Stunden vorher gefüllt worden war.

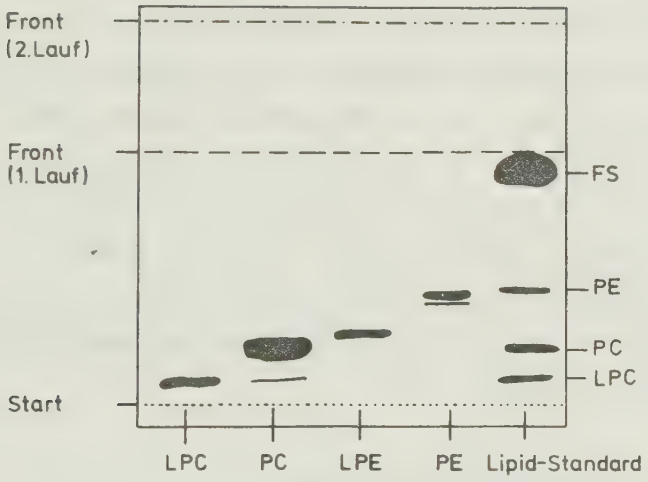

Abb. 5 Zwei-Stufen-dünnschichtchromatographische Auftrennung der gereinigten Substrate aus Sojabohnen auf Kieselgel-DC-Fertigplatte (20 cm x 20 cm; Schichtdicke 0,25 nm).
Als erstes Laufmittel wurde ein Chloroform:Methanol: Wasser-Gemisch (56:24:4 v/v) verwendet, als zweites Laufmittel ein Hexan-Diäthyläther-Eisessig-Gemisch (80:20:1,2 v/v).

2.18.1. Zwei-Stufen-Dünnschichtchromatographie

Die Zwei-Stufen-Dünnschichtchromatographie wurde für die Trennung von Lipidgemischen, die sowohl polare als auch unpolare Lipide enthielten, eingesetzt. Die Auftrennung der polaren Lipide erfolgte im ersten Lauf durch das Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser (56:24:4 v/v). Die unpolaren Lipide wandern hierbei mit der Laufmittelfront. Beim ersten Lauf wurde die Steighöhe des Laufmittels auf 12 cm begrenzt. Der zweite Lauf erfolgte nach einer Stunde mit dem Laufmittel Hexan:Diäthyläther: Eisessig (80:20:1,2 v/v). Dabei wurden die unpolaren Lipide im oberen Abschnitt der Platte aufgetrennt. Die im ersten Lauf aufgetrennten polaren Lipide bleiben am Kieselgel adsorbiert. Durch ein am Rand der Platte aufgetragenes und mitaufgetrenntes Standard-Lipid-Gemisch konnten die Sojabohnen- bzw. Serumlipide nach Anfärbung der Banden mit Joddampf identifiziert werden.

2.18.2. Ein-Stufen-Dünnschichtchromatographie

Durch dieses Verfahren läßt sich ein Gemisch von freien Fettsäuren und gereinigtem Phosphoglycerid oder Lysophosphoglycerid voneinander trennen. Als Laufmittel wurde Chloroform:Methanol:Wasser:Eisessig (56:24:3,5:0,5 v/v) verwendet. Die Laufzeit betrug etwa 2 Stunden, die Steighöhe 15 cm. Nach dem Entfernen der Platten aus der Laufkammer wurden sie zum Trocknen gelegt. Nach einer Stunde wurden die Platten angefärbt und die Banden der getrennten Lipide durch Umstechen mit einer Nadel markiert.

2.19. Quantitative Bestimmung von Phosphoglyceriden und Lysophosphoglyceriden mittels Phosphorbestimmung nach Fiske-Subbarow (101)

2.19.1. Reinigung der Glaswaren

Die bei der Phosphorbestimmung verwendeten Glaswaren wurden nach der Vorreinigung mit Leitungswasser mindestens 10 Stunden lang in Chromschwefelsäure gehalten. Danach wurden sie 24 Stunden in fließendem Leitungswasser gewässert, dreimal mit Aqua dest. und dreimal mit Aqua bidest. gespült und bei 200°C getrocknet.

2.19.2. Veraschung nach Bartlett (102)

Das Kieselgel aus den angezeichneten Banden der Dünnschichtchroamtographie wurde in Schliffröhrchen überführt, die 0,4 ml 20%-ige Perchlorsäure enthielten. Nach Zugabe von weiteren 0,3 ml Perchlorsäure und Durchmischung mit dem Whirlmixer erfolgte die Veraschung im Aluminiumblock bei 180°C während 45 min.

2.19.3. Farbentwicklung und Messung

Nach dem Abkühlen der Röhrchen wurden 4,6 ml einer 22%-igen Ammoniummolybdatlösung sowie 0,2 ml Fiske-Subbarow-Reagenz zugegeben und gemischt. Die Farbentwicklung erfolgte während der 10-minütigen Erhitzung im Wasserbad nahe der Siedetemperatur. Bei der unmittelbar anschließenden Zentrifugation (1980 x g) für 5 Minuten setzte sich das Kieselgel am Boden des Röhrchens ab. Die Extinktion des Überstandes wurde in einem Spektralphotometer bei 830 nm gegen einen phosphorfreien Leerwert gemessen. Als Kontrollwert dienten Proben, die phospholipidfreies Kieselgel aus den gleichen Dünnschichtplatten enthielten. Zu Quantifi-

zierung des Phosphorgehaltes wurde die Extinktion der Eichwerte bestimmt, die 2 µg Phosphat (0,5 ml einer Standardlösung von Dinatriumphenylphosphat = 16,407 µg Dinatriumphenylphosphat) enthielten.
Zur Berechnung der Konzentration des Phospholipidgehaltes wurde folgende Formel verwendet:

$$P_p\ (\mu g) = 2 \cdot \frac{E_p}{E_k}\ \mu g\ ,$$

Hierbei bedeuten:

P_p (µg) = Phosphormenge der aus der DC-Platte entnommenen Probe in µg,
E_p = Extinktion der Probe,
E_k = Extinktion der Kontrollösung.

Zur Umrechnung der Gramm-Werte in Mol-Werte wurden folgende Daten (Tab. 1) zugrunde gelegt:

Tab. 1 Die Molekulargewichte und Phosphorgehälte einiger Substrate

Substrat	Molekulargewicht	Phosphorgehalt Gew. %
Phosphatidylcholin	794,19	3,90
Lysophosphatidylcholin	519,71	5,96
Phosphatidyläthanolamin	751,19	4,13
Lysophosphatidyläthanolamin	476,71	6,50

2.19.4. Herstellung von Fiske-Subbarow-Reagenz (101)

In einem 100 ml Erlenmeyerkolben wurden 6,85 g Natriumpyrosulfit in 50 ml bidest. Wasser gelöst. Dazu wurde 0,125 g 1-Amino-2-hydroxy-naphthalinsulfonsäure-(4) gegeben und bis zur vollständigen Lösung der Substanzen geschüttelt. In einem Reagenzglas wurden 1,5 g wasserfreies Natriumsulfit in 5 ml bidest. Wasser gelöst und dann tropfenweise solange zur ersten Lösung gegeben, bis dort die Trübung verschwand. Nach anschließender Filtration und zweitätiger Aufbewahrung im Dunkeln war die Lösung gebrauchsfertig. Sie sollte binnen zwei Wochen verwendet werden.

2.20. Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Sojabohnen- und Serum-Substraten

Um den Fettsäuregehalt der unterschiedlichen Substrate zu ermitteln, wurde von jedem Substrat eine Totalhydrolyse durchgeführt und dabei die freigesetzten Fettsäuren gaschromatographisch bestimmt.
Die Totalhydrolyse der verschiedenen Phosphoglyceride und Lysophosphoglyceride erfolgte in Anlehnung an Dawson (103).
Substratproben von Sojabohnen- und Serum-Phosphoglyceriden, die nicht mehr als 100 µg Lipidphosphor enthalten, wurden durch Rotationsverdampfung bei 30-35°C zum Trocknen gebracht. Der Rückstand wurde in 0,8 ml Tetrachlorkohlenstoff aufgelöst. Daraufhin folgte die Zugabe von 7,5 ml Äthanol, 0,65 ml dest. Wasser und 0,25 ml 1N-NaOH. Das Gemisch wurde 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 0,4 ml Äthylformiat hinzugefügt, gemischt und 5 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Das gewonnene Hydrolysat wurde dann im Vakuum getrocknet.

Ein Teil Wasser und zwei Teile Chloroform:Isobutanol (2:1 v/v)-Mischung wurden im Scheidetrichter einige Minuten geschüttelt und zur Entmischung stehen gelassen. 1 ml der wässrigen Oberphase und 2 ml der unteren Lösungsmittelphase wurden dem getrockneten Rückstand des Hydrolysates zugegeben und unter leichtem Erwärmen geschüttelt. Diese Emulsion wurde dann so vollständig als möglich in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5 minütiger Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase entnommen und zum Trocknen gebracht.
Die durch diese Totalhydrolyse freigesetzten Fettsäuren wurden nach der Methode von Dole (104) extrahiert, mit Veresterungsreagenz (N-N-Dimethylformamiddimethylacetal) (105) verestert und anschließend gaschromatographisch bestimmt.

2.21. Quantitative Bestimmung der Enzymaktivität

2.21.1. Vorbereitung der Enzymansätze

Zur Austestung der enzymatischen Aktivität in delipoproteiniertem Serum oder enzymhaltigen Serumfraktionen wurden Ansätze mit einfacher und doppelter Proteinmenge sowie entsprechende Leeransätze hergestellt. Das Substrat wurde in Konzentration von 1 µMol/ml verwendet. Bei Ansätzen mit einfacher Enzymmenge wurden dem Substrat 1 ml der zu prüfenden Proteinlösung und 1 ml Pufferlösung zugesetzt. Bei Ansätzen mit doppelter Enzymmenge erfolgte eine Zugabe von 2 ml Proteinlösung. Bei Leerwertansätzen wurden dem Substrat 2 ml Pufferlösung zugegeben. Nach Durchmischung von Proteinlösung und Substralösung erfolgte die Inkubation für 3 Stunden bei 37^{o}C unter Schütteln.

2.21.2. Extraktion der Lipiden

Die Lipidextraktion aus Enzymsätzen wurde nach einem modifizierten Verfahren von Habermann et al (106) durchgeführt. Hierfür wurden die Enzymansätze friergetrocknet und die Trockensubstanz in 7 ml Methanol suspendiert. Darauf folgte die Zugabe von 7 ml Chloroform, das Gemisch wurde mit dem Whirlmixer ca. 15 sec. durchmischt und im Wasserbad bei 30°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von weiteren 7 ml Chloroform wurde die Oberphase über einen Filter in ein Schliffzentrifugenglas dekantiert, das Sediment erneut mit 10 ml Chloroform:Methanol (2:1 v/v) aufgeschwemmt und in das Schliffzentrifugenglas filtriert. Der Lipidextrakt wurde im Rotationsverdampfer zum Trocknen gebracht und anschließend in 1 ml Chloroform:Methanol (2:1 v/v) erneut gelöst.

2.21.3. Bestimmung der Enzymaktivität mittels Dünnschichtchromatographie

Bei dieser Methode wurden 100 µl Lipidextraktlösung auf einer DC-Kieselgel-Platte aufgetragen und mit Hilfe des Laufmittels in verschiedene Lipidklassen voneinander getrennt. Die erhaltenen Banden ließen sich durch Mitlaufen einer Standardlösung und darauffolgender Jod-Anfärbung qualitativ bestimmen. Durch Phosphorbestimmung der ausgekratzten Bande wurde die Substratabnahme quantitativ bestimmt.

2.21.4. Extraktion der freien Fettsäuren aus Enzymansätzen

Die Extraktion von freien Fettsäuren aus Serum oder aus Enzymansätzen erfolgte nach der Methode von Dole (104). Je Enzymansatz wurden 5 ml

Dole-Extraktionsmischung (Isopropanol:Heptan:1N-Schwefelsäure, 40:10:1 v/v) zur Extraktion verwendet. Nach kräftigem Schütteln ließ man das Gemisch 10 Minuten lang stehen. Darauf folgte der Zugabe von 4 ml Heptan und 2 ml gekochtes bidest. Wasser. Die verschlossenen Röhrchen wurden gut geschüttelt und noch 10 Minuten stehengelassen. Nach Trennung der beiden Phasen wurde die Oberphase quantitativ abgehoben und die Unterphase verworfen. Zu der oberen Phase wurden 5 ml 0,5%-iger Schwefelsäurelösung gegeben und gut durchmischt. Nach 5 minütiger Zentrifugation wurde die obere Phase, mit den freien Fettsäuren, abpipettiert und in ein Spitzglaskölbchen überführt.

2.21.5. Bestimmung der Enzymaktivität mittels Gas-Flüssig-Chromatographie

Bei diesem Verfahren wird ein inertes Trägergas wie z.B. Stickstoff dazu benutzt, die verdampften Methylester des Fettsäuregemisches bei hoher Temperatur durch ein langes, beheiztes Kapillarrohr zu transportieren, dessen Innenwand mit einer stationären flüssigen Phase beschichtet ist. Die Methylester der verschiedenen Fettsäuren verteilen sich zwischen der Gas- und der Flüssigphase entsprechend ihren Verteilungskoeffizienten (107). Die getrennten Methylester verlassen die Säule schließlich mit dem Trägergas und können mittels sehr empfindlicher physikalischer Methoden nachgewiesen werden. Beim Verlassen der Säule passieren die Bestandteile einen Detektor, dieser ist über einen Verstärker mit einem Schreiber gekoppelt. Es ergibt sich ein Chromatogramm mit verschiedenen Gipfeln, die den einzelnen Fettsäuren entsprechen. Die Menge der einzelnen Fettsäuren errechnet sich aus der Fläche unter der jeweils zugehörigen Kurve.

2.21.4.1. Meßbedingungen

Ein Gaschromatograph Typ (hp 402), Hewlett Packerd, wurde zur Bestimmung der Fettsäuren von C_{12} - C_{24} unter folgenden Meßbedingungen verwendet: Eine Glassäule (Länge 1,8 m, Durchmesser 3 mm) gefüllt mit 15% DEGS auf Gaschrom P (100 - 120 mesh), Säulentemperatur 200°C, Injektortemperatur 220°C und Detektortemperatur 245°C. Als Trägergas wurde Stickstoff (reinst) verwendet, dessen Durchflußgeschwindigkeit auf 40 ml/min geregelt wurde.

2.21.4.2. Vorbereitung der Proben für Gas-Flüssig-Chromatographie

Nach Inkubation der Enzymansätze wurden die freigesetzten Fettsäuren nach der Methode von Dole (104) extrahiert, das Lösungsmittel durch Rotationsverdampfung entfernt und der Rückstand in 100 µl Hexan aufgelöst. Diese Lösung wurde anschließend zur Veresterung mit 200 µl N,N-Dimethylformamiddimethylacetal gebracht. Nach der Veresterung wurden die Proben im Vakuum getrocknet und der Rückstand in 100 µl Essigsäureäthylester aufgelöst.

2.21.4.3. Auswertung der erhaltenen Gaschromatogramme und Berechnung der Konzentration der einzelnen Fettsäuren

Die Gipfelfläche, sowie auch unter bestimmten Voraussetzungen die Gipfelhöhe, ist der Menge der jeweils gemessenen Komponente proportional. Bedingungen für diese Prpoportionalität ist jedoch, daß der signalerfassende Detektor und das dazugehörige Registriergerät in ihren "linearen" Bereichen arbeiten. Nur innerhalb des linearen Bereiches des Detektors ist das Signal proportional der jeweils angezeigten Substanzkonzentration

im Trägergas. Die aufgebrachten Probenmengen dürfen also nur so hoch sein, daß man sich mit den auszuwertenden Komponenten im linearen Detektionsbereich befindet. In der analytischen Praxis werden Gipfelhöhen im allgemeinen nur zur ungefähren Abschätzung der in der Mischung vorliegenden Substanzmenge harangezogen. Sie sind nämlich bei gegebener Substanzmenge abhängig von der Reaktionszeit und der Gipfelsymmetrie der betreffenden Gipfel, während die Gipfelfläche bei linearer Detektion und richtiger Integration weder von der Retentionszeit noch von der Gipfelsymmetrie abhängig ist. Zur Flächenberechnung wurde das Näherungsverfahren (Gipfelhöhe x Halbwertsbreite) angewandt (107). Dieses Verfahren ist anwendbar, wenn die Gipfel symmetrisch sind und in einem Chromatogramm keine verschiedenartigen Gipfelformen vorkommen. Die Gesamtprobenmenge wird bestimmt aus der Summe aller ausgewerteten Gipfelflächen. Es wird eine zusätzliche, aber bekannte Komponente in bekannter Konzentration, also durch Einwaage, der Originalmischung zugefügt und aus dem Gaschromatogramm die relativen Flächenwerte aller Komponenten (standardisiert auf diese Verbindung) bestimmt. Von der zugefügten Komponente, dem "inneren Standard" muß die genaue Position im Chromatogramm bekannt sein. Außerdem sollten die Konzentrationen des inneren Standards und der zu bestimmenden Komponenten ungefähr in der gleichen Größenordnung liegen.

2.22. Molekulargewichtsbestimmung mittels Gel-Filtration mit Sephadex-G-200

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde die Versuchstechnik der Gelfiltration mit Sephadex-G-200 verwendet.
Da das Elutionsvolumen einer bestimmten Substanz von der Molekulargröße abhängig ist, wird das Molekulargewicht einer unbekannten Substanz mit-

tels des Elutionsvolumens erfaßt.

Die Säule muß geeicht werden, d.h., die Elutionsvolumina von Testsubstanzen müssen mit deren Molekulargewichten in eine Beziehung gesetzt werden. Die Vorbereitung der Gelfiltrationssäule mit Sephadex-G-200 wurde in Anlehnung an Andrews (108) durchgeführt.

Trockenes Sephadex-G-200 wurde zum Aufquellen mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer mit 0,1 M KCl, pH=7,5 versetzt und drei Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Während dieser Zeit wurde mehrmals umgerührt und nach dem Absetzen des Gels dekantiert, die Hauptmenge der feinen, flattierenden Partikel abgegossen und frischer Puffer dazugegeben.

Zum Füllen der Säule wurde das gequollene Gel erneut dekantiert und mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer mit 0,1 M KCl (pH=7,5) zu einem homogenen Brei aufgeschwemmt. Zur Entfernung von Luftblasen wurde das Sephadex im Exsikkator mit einer Pumpe evakuiert, bis keine Luftblasen mehr hochstiegen.

Die Säule mit den Maßen (Länge 90 cm; Durchmesser 3 cm), wurde senkrecht eingespannt und in einem Guß entlang einem Glasstab unter Vermeidung von Luftblasenbildung gefüllt. Nachdem sich das Gel einige Zentimeter abgesetzt hatte, wurde der Ausflußschlauch gesenkt. Das aus dem Schlauch austropfende Volumen wurde durch Nachfließen von Puffer ersetzt. Falls die gewünschte Säulenhöhe noch nicht erreicht war, wurde erneut Gelsuspension nachgegossen.

Zum Äquilibrieren wurde die Säule 48 Stunden lang bei $4^{o}C$ mit Puffer durchgespült. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden in 0,05 M Tris/HCl-Puffer mit 0,1 M KCl (pH=7,5) aufgenommen und auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Elution dieser Proteine erfolgte durch Durchwaschen mit demselben Puffer. Die Ausflußgeschwindigkeit betrug etwa 2,5 ml/Stunde.

2.22.1. Eichung der Gelfiltrationssäule

Zunächst wurde das Ausflußvolumen der Säule (V_o) bestimmt, indem eine Dextran-Blau-Lösung von 2 ml auf die Säule aufgetragen und durch 0,05 M Tris/HCl-Puffer eluiert wurde. Das Volumen dieses Eluats wurde gemessen und für Berechnung der "relativen Elutionsvolumen" ($Ve/_{Vo}$) benützt. Eichproteine von bekannten Molekulargewichten (Tab. 2) wurden zur Kalibrierung der Säule verwendet.

Tab. 2 Eichproteine zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule

Protein	Molekulargewicht
Cytochrom C (aus Pferdeherz)	11 700
Ovalbumin	41 000
Rinderserumalbumin (BSA)	56 000
α-Amylase (aus B.subtilis)	96 900
Katalase (aus Rinderleber)	190 000
Katalase (aus Bakterien)	247 500

2.23. Isoelektrische Fokussierung

Das Verfahren der isoelektrischen Fokussierung wurde zur Prüfung der Reinheit des Enzympräparates verwendet. Dazu wurde dieses Enzympräparat auf einer Polyacrylamid-Gel-Platte aufgetragen, in deren Gel-Schicht Ampholin enthalten waren. Die Gelvorbereitung wurde nach der Methode von Bours (109) vorgenommen. Es wurde ein Flachbett-Polyacrylamidgel (108 mm x 24 mm x 2,0 mm, T=5%, C=3%) gegossen und mittels UV-Licht polymerisiert. Durch Zugabe von Ampholinen für die pH-Bereiche von 3,5-11 (2,8 ml), pH 9-11 (0,4 ml), pH 4-6 (0,2 ml) und pH 5-7 (0,2 ml) wurde eine optimale Proteinauftrennung für den pH-Bereich 3,5-9,5 gewährleistet. Der Anodenfilterpapierstreifen wurde mit 1 M H_3PO_4, der kathodische Filterpapierstreifen mit 1 M NaOH getränkt. Die Probe trug man direkt auf die Geloberfläche auf, verteilte sie und ließ sie einziehen. Die Probenauftrennung wurde mittels eines LKB 2117 Multiphor-Elektrophoresegerätes bei einer maximalen Spannung von 1500 V in einem Zeitraum von 2 Stunden vorgenommen. Nach Abschluß der isoelektrischen Fokussierung wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Balu R 250 (0,5% in Äthanol/H_2O/Eisessig, 45:45:10, v/v) für 10 Stunden angefärbt. Mit einem Äthanol/Wasser/Eisessig-Gemisch (45:45:10 v/v) wurde mehrere Tage entfärbt.

3. Ergebnisse

3.1. Versuche zur quantitativen Bestimmung von Fettsäuren mittels Gas-Flüssig-Chromatographie

Die Technik der Gas-Flüssig-Chromatographie benutzt die unterschiedliche Verteilung der Fettsäuren im dampfförmigen Zustand zwischen einer mobilen Gasphase (Trägergas) und einem lipophilen, großflächigen Flüssigkeitsfilm (Imprägnierung des Säulenfüllmaterials).
Die ausgeprägte Neigung der freien Fettsäuren, im dampfförmigen Zustand zu dimerisieren, führt zu asymmetrischen Banden im Gaschromatogramm mit nur allmählich auslaufenden Profilen. Deshalb hat sich die gaschromatographische Auftrennung der Fettsäuren als Methylester weitgehend durchgesetzt.
Zur Methylveresterung der Fettsäuren wurde das Reagenz N,N-Dimethylformamiddimethylacetal (105) verwendet. Die optimalen Veresterungsbedingungen sind durch die folgenden Versuche ermittelt worden.

3.1.1. Versuche zur Ermittlung der optimalen Veresterungsbedingungen

Die Veresterung der Fettsäuren erfolgte durch Mischung der Fettsäurelösung mit dem Reagenz (N,N-Dimethylformamiddimethylacetal) und anschließendem Stehenlassen in einem Wasserbad bei Siedetemperatur. Um die optimalen Veresterungsbedingungen zu erfassen, wurde die Dauer der Veresterungsreaktion, sowie die Veresterungstemperatur und das Verhältnis der Ausgangsprodukte systematisch verändert.

3.1.1.1. Veresterungsdauer

Eine Standardfettsäurelösung aus Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und Linolsäure (je 2 mg/ml Hexan) wurde hergestellt. Zu je 100 µl Fettsäurelösung wurden 200 µl Veresterungsreagenz (N,N-Dimethylformamid-dimethylacetal) zugegeben. Die Reaktionspartner wurden unterschiedlich lang -zwischen 5 und 60 Minuten- im siedenden Wasserbad gehalten. Anschließend wurden diese Ansätze zum Trocknen gebracht. Die Rückstände wurden in jeweils 100 µl Essigsäureäthylester gelöst und hiervon 5 µl zur gaschromatographischen Bestimmung von Fettsäureestern verwendet. Aus dem Chromatogramm wurden die Gipfel-Flächen der einzelnen Fettsäuren berechnet. Um die Ausbeute an Fettsäureester vergleichen zu können, wurden die spezifischen Flächen der einzelnen Fettsäuren dividiert durch die Menge der injizierten Fettsäuremethylester. Man erhält dabei einen konstanten Umrechnungsfaktor.

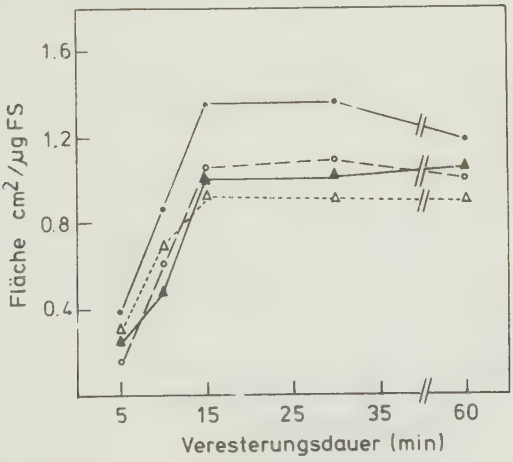

Abb. 6 Vergleich der Ausbeute an Fettsäuremethylester in Abhängigkeit von der Veresterungsdauer.
(•——•) Pl-MS, (▲——▲) Ls-MS, (•- - -•) Öl-MS,
(▲- - -▲) St.MS .

Ergebnis:

Bei Veresterung im siedenden Wasserbad steigt die Menge an Fettsäureestern mit der Veresterungsdauer an und erreicht dann bei 15 Minuten ein Plateau (Abb. 6). Diese erreichte Zeit liegt allen folgenden Versuchen zugrunde.

3.1.1.2. Reaktionstemperatur

Thenot et al (105) schlug als Reaktionstemperatur 60°C für die Veresterung vor. In meinem Versuch wurden die Reaktionspartner (Fettsäurelösung und Veresterungsreagenz) unterschiedlich lang bei 100°C und bei 60°C verestert.

Die Ausbeute an Fettsäuremethylester in Abhängigkeit mit der Zeit ist in Abb. 7 dargestellt.

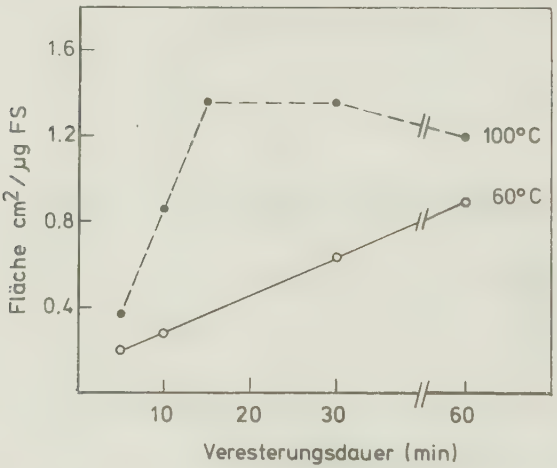

Abb. 7 Vergleich der Ausbeute an Fettsäuremethylester in Abhängigkeit von Reaktionsdauer und -temperatur. (●---●) Pl-MS bei 100°C, (o——o) Pl-MS bei 60°C.

Ergebnis:

Die Ausbeute an Fettsäuren steigt entgegen der Angabe von Thenot (105) bei 60°C langsam an. Bei 100°C ist die Reaktion hingegen früher abgeschlossen. Bei diesem Versuch wird also neben der Veresterungsdauer von 15 Minuten auch die Reaktionstemperatur auf 100°C festgesetzt.

3.1.1.3. Verhältnis der Reaktionspartner

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen optimale Veresterungsdauer und Temperatur bereits festgelegt waren, wurde das Verhältnis der beiden Reaktionspartner geprüft. Dazu wurden 100 µl Fettsäurelösung (s.3.1.1.1) mit unterschiedlichen Mengen N,N-Dimethylformamiddimethylacetal verestert. Nach der Veresterung wurden die Ansätze unter Vakuum zum Trocknen gebracht, der Rückstand in 100 µl Essigsäureäthylester aufgelöst und davon 5 µl zur Bestimmung eingespritzt.

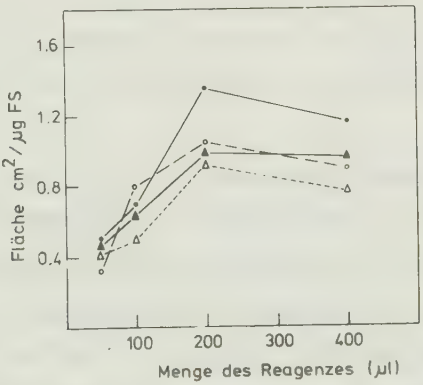

Abb. 8 Vergleich der Ausbeute an Fettsäuremethylester durch Verwendung von 100 µl Fettsäurelösung und unterschiedlichen Mengen des Veresterungsreagenz. (•——•) Pl-MS, (▲——▲) Ls-MS, (o---o) Öl-MS, (▲---▲) St-MS.

Ergebnis:

Die höchste Ausbeute erhält man bei einem Verhältnis von 100 µl Fettsäurelösung zu 200 µl Veresterungsreagenz (Abb. 8). Mit diesem letzten Ergebnis haben wir die Grundlage für ein optimales Veresterungsverfahren geschaffen. Im einzelnen bedeuten diese Optima: eine Mischung von 100 µl Fettsäurelösung mit 200 µl Veresterungsreagenz und eine Veresterungsdauer von 15 Minuten bei einer Reaktionstemperatur von 100°C.

3.2. Bestimmung von Fettsäureestern durch Gas-Flüssig-Chromatographie

Für die praktische Durchführung der gaschromatographischen Analyse von Gemischen, welche Fettsäuren (als Methylester) mit einer Kettenlänge von 10 bis 24 Kohlenstoffatomen enthalten, müssen bestimmte Betriebsbedingungen gewährleistet sein. Im vorliegenden Falle sind dies: Säulenabmessungen 1,8 m x 3 mm, Säulenfüllung 15% DEGS auf Gaschrom P (100-120 mesh), Durchflußgeschwindigkeit des Trägergases (Stickstoff) 40 ml/min, Säulentemperatur 200°C, Injektortemperatur 220°C, Detektortemperatur 245°C.

Die erhaltenen Chromatogramme müssen sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet werden. Zur Identifizierung der einzelnen Spitzen kann man ihre Retentionszeiten mit denjenigen vergleichen, die sich aus einem unter gleichen Bedingungen gewonnenen Chromatogramm eines bekannten Methylestergemisches ergeben. Für die quantitative Auswertung eines Chromatogramms ist die Proportionaliät zwischen eingesetzter Substanzmenge und Detektoranzeige Voraussetzung. Diese erreicht man bei der Chromatographie durch Dosierungssteigerung der eingespritzten Substanz-

mengen und Variierung des Gewichtsanteils einer Substanz in einem Zweikomponentengemisch. Weiter muß festgestellt werden, ob alle Substanzen mit der gleichen Empfindlichkeit angezeigt werden. Aufschlüsse gibt die chromatographische Untersuchung eingewogener Testgemische.

3.2.1. Chromatographische Untersuchung eines Standardgemisches

Für die quantitativen Untersuchungen von unbekannten Fettsäuregemischen war jedoch zunächst die Austestung der Empfindlichkeit der Fettsäure-Extraktionsmethode notwendig.

3.2.1.1. Empfindlichkeit der Extraktionsmethode

Zu diesem Zweck wurde eine Fettsäurestandardlösung hergestellt, welche je ml jeweils 100 µg Palmitinsäure, Palmitoleinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Arachinsäure, Linolensäure und Arachidonsäure enthält. Ein Teil dieser Lösung wurde unmittelbar ohne Extraktion zur Veresterung gebracht und danach zur gaschromatographischen Bestimmung verwendet. Ein zweiter Teil dieser Lösung wurde zuerst nach der Methode von Dole (104) extrahiert. Danach wurde der Extrakt in zwei Gruppen geteilt. Die Fettsäuren der ersten Gruppe wurden verestert und gaschromatographisch bestimmt. Die Fettsäuren der zweiten Gruppe mußten zunächst auf Dünnschichtchromatographieplatten aufgetrennt werden. Nach der Auftrennung wurden die Banden der Fettsäuren ausgekratzt, in Chloroform gelöst, mit N,N-Dimethylformamiddimethylacetal verestert und gaschromatographisch bestimmt. Die Ausbeute an extrahierten Fettsäuren mit und ohne Dünnschichtchromatographie ist in den Tabellen 3 und 4 wiedergegeben.

Tab. 3 Die Ausbeute an extrahierten Fettsäuren ohne Dünnschicht-chromatographie

Fettsäure		injizierte Menge	Fläche cm^2		Ausbeute
			ohne Extraktion	nach Extraktion	(%)
Palmitinsäure	16:0	5 µg	6,42	6,13	95
Palmitoleinsäure	16:1		4,64	4,32	93
Stearinsäure	18:0		5,91	5,74	97
Ölsäure	18:1		5,80	5,45	94
Linolsäure	18:2		4,35	4,02	92
Arachinsäure	20:0		6,31	5,87	93
Linolensäure	18:3		2,76	2,43	88
Arachidonsäure	20:4		4,90	4,05	83

Tab. 4 Die Ausbeute an extrahierten Fettsäuren mit anschließender dünnschichtchromatographischer Auftrennung

Fettsäure		injizierte Menge	Fläche cm^2		Ausbeute (%)
			ohne DC	mit DC	
Palmitinsäure	16:0	5 µg	6,13	5,45	89
Palmitoleinsäure	16:1		4,32	3,45	80
Stearinsäure	18:0		5,74	5,30	92
Ölsäure	18:1		5,45	3,52	65
Linolsäure	18:2		4,02	1,94	48
Arachinsäure	20:0		5,87	2,37	40
Linolensäure	18:3		2,43	1,14	47
Arachidonsäure	20:4		4,05	0,42	10

Ergebnis:

Die Ausbeute an Fettsäuren der ersten Gruppe schwankt zwischen 83% und 97% (Tab. 3). Gewisse Abweichungen ergeben sich bei Extraktion und anschließender Dünnschichtchromatographie (Tab. 4).

Durch die Extraktion der auf Kieselgelplatten aufgetrennten freien Fettsäuren bleibt ein gewisser Anteil ungesättigter Fettsäuren am Kieselgel haften. Die niedrige Ausbeute an ungesättigten Fettsäuren weist darauf hin, daß die Verwendung der dünnschichtchromatographischen Trennung von Fettsäuren nachteilig ist. In den folgenden Versuchen werden die Fettsäuren aus dem Inkubationsmedium extrahiert und direkt verestert.

3.2.1.2. Eichung

Die Standardsäurelösung (s. 3.2.1.1.) wurde in 1 ml-Mengen nach der Methode von Dole (104) extrahiert. Der Extrakt wurde im Vakuum getrocknet, der Rückstand in 100 µl Hexan gelöst und mit 200 µl N,N-Dimethylformamiddimethylacetal verestert. Nach der Veresterung wurde der methylierte Extrakt einrotiert und schließlich der trockene Rückstand in 100 µl Essigsäureäthylester aufgelöst. Aus jedem Ansatz wurden nacheinander 1, 3, 5 und 7 µl-Mengen zur Fettsäurebestimmung mittels Gas-Flüssig-Chromatographie verwendet. Die Reproduzierbarkeit der Eichwerte konnte durch mindestens zehnmalige Widerholung des Versuchs ermittelt werden.

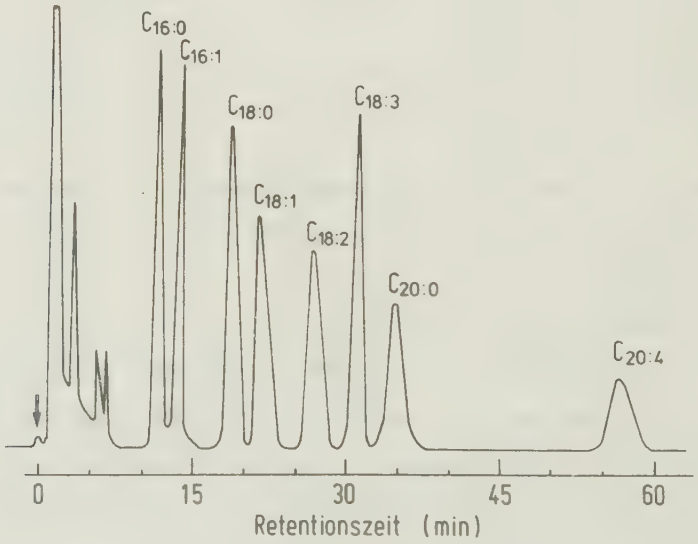

Abb. 9 Gaschromatographische Auftrennung von einem Fettsäuremethylester-Gemisch. Glassäule (1,8 m x 3 mm), Säulenfüllung 15% DEGS auf Gaschrom P (100-120 mesh), Injektortemp. 220°C, Säulentemp. 200°C, Detektortemp. 245°C, Trägergas 40 ml/min.

Tab. 5 Verhältnis zwischen den erhaltenen Flächen (cm^2) und den injizierten Mengen (µg) der Fettsäureester-Gemische

	Fläche cm^2/µg Fettsäure							
Fettsäure	Ps	Pls	Sn	Öl	Ls	Ar	Lns	Ard
	1,21	1,14	1,27	1,28	0,95	1,26	0,67	1,03
	1,36	1,20	0,92	1,04	1,00	1,32	0,62	0,88
	1,28	1,22	1,18	1,16	0,87	1,26	0,64	0,98
	1,11	1,04	1,07	1,30	0,89	1,33	0,73	1,13
	1,18	1,00	1,32	1,08	0,98	1,11	0,70	1,17
	1,16	0,92	1,17	1,04	1,02	1,18	0,67	1,12
	1,18	1,06	1,12	1,28	1,04	1,13	0,64	1,07
	1,32	1,04	1,24	1,16	0,95	1,27	0,68	0,88
	1,24	1,14	1,05	1,32	0,87	1,26	0,77	0,97
	1,16	1,06	1,03	1,11	0,98	1,11	0,72	1,05
$\bar{X}$	1,22	1,08	1,14	1,17	0,96	1,22	0,68	1,03
SD	±0,07	±0,08	±0,11	±0,10	±0,05	±0,07	±0,04	±0,07

Tab. 6 Die Menge an Fettsäure, die 1 cm^2 Flächeneinheit entspricht unter den Veresterungsbedingungen (s.3.2.).

Fettsäure		Fläche (cm^2)	µg Fettsäure
Palmitinsäure	16:0	1	0,82
Palmitoleinsäure	16:1	1	0,93
Stearinsäure	18:0	1	0,88
Ölsäure	18:1	1	0,85
Linolsäure	18:2	1	1,04
Arachinsäure	20:0	1	0,82
Linolensäure	18:3	1	1,47
Arachidonsäure	20:4	1	0,97

Ergebnis:

Die Verteilung der verschiedenen Fettsäureester ließ sich durch eine qualitative Auswertung des erhaltenen Chromatogramms (Abb. 9) darstellen. Sowohl die Retentionszeiten der verschiedenen Fettsäureester wie auch die Flächen unter den erhaltenen Spitzen wurden berechnet. Hierbei ließen sich die Mengen von 1 µl und 3 µl nicht gut reproduzieren. Die besten Ergebnisse erzielt man bei Injektion von 5 µl-Mengen.
Das Verhältnis zwischen den erhaltenen Flächen in cm^2 und den injizierten Mengen der Fettsäureestern in µg ist in Tab. 5 wiedergegeben. Es konnte gezeigt werden, daß diese Eichwerte gut reproduzierbar sind.
Die Menge an Fettsäuren, die 1 cm^2 Flächeneinheit entspricht, wurden in Tab. 6 umgerechnet und für weitere Bestimmungen der Fettsäuren unter gleichen Bedingungen herangezogen.

3.3. Nachweis der Lysolecithinase-Aktivität in ultrazentrifugiertem Serum in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

In diesem Versuch wurde lipoproteinfreies Humanserum verwendet, um die Einwirkung von Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) auf das lipoproteingebundene Lecithin zu vermeiden. Zunächst wurde das Serum mit KBr auf eine Dichte von 1,21 g/ml eingestellt und anschließend bei 318 000 x g zentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation wurde das Serum in Phosphatpuffer (0,02 M; pH=7,4) dialysiert. Als Substrat wurde Soj-LPC in Phosphatpuffer verwendet. Hierbei hatten wir die Schaffung möglichst günstiger Reaktionsbedingungen zum Ziel. Das Substrat wurde dem Inkubationsmedium im Überschuß hinzugefügt, um eine lineare Kinetik zu gewährleisten. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration läßt sich durch Verwendung zweier unterschiedlicher Enzymkonzentrationen feststellen. Ultrazentrifugiertes Serum, dem das Bakteriocidium Cialit (1:10 000) zugesetzt worden war, wurde mit dem Substrat versetzt und verschieden lang für 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Aktivität wurde in den zwei Serumvolumina (1 ml und 2 ml) getestet, während das Substrat in drei Konzentrationen je 0,5 µMol, 1 µMol und 1,5 µMol Ansatz verwendet wurde. Kontrollansätze wurden parallel dazu hergestellt und bei 4°C im Kältelabor aufbewahrt. Die Veränderungen an Lysophosphatidylcholingehalt sowie an freien Fettsäuren in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer wurden erfaßt. Die Menge an abgebauten Lysophosphatidylcholin bzw. freigestzter Fettsäure wird in nMol/Ansatz angegeben (Abb. 10).

Ergebnis:

Aus Abb. 10 ist zu ersehen, daß mit zunehmender Inkubationsdauer die Menge an Lysophosphatidylcholin ab- und die Konzentration an freien Fettsäuren zunimmt.

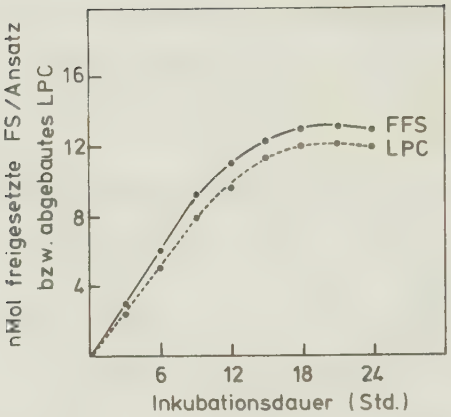

Abb. 10 Abhängigkeit des Lysophosphatidylcholinabbaues (•----•) bzw. der Freisetzung der Fettsäuren (•——•) von der Inkubationsdauer.

Die enzymatische Aktivität steigt in dem Bereich von 0 bis 9 Stunden linear an. Nach einer Inkubationsdauer von 21 Stunden verändert sich der Gehalt an Lysophospahtidylcholin und an freien Fettsäuren nur noch geringfügig. Da sich die Bestimmung von freigesetzten Fettsäuren als einfacher und präziser als die Bestimmung von abgebauten Lysophosphatidylcholin erwies, wurden in den folgenden Versuchen nur die freigesetzten Fettsäuren bestimmt. Aus Abbildungen 11 und 12 geht hervor, daß die enzymatische Aktivität nach drei Stunden Inkubationszeit bei Verwendung der einfachen Serummenge genau halb so groß wie bei der Verwendung der doppelten Serummenge ist, und dies bei allen drei Substratkonzentrationen. Dies zeigt an, daß das Substrat im Überschuß vorhanden ist und zwischen Enzymmenge und Enzymaktivität nach dreistündiger Inkubation eine direkte Proportionalität besteht. Unter diesen Bedingungen handelt es sich um eine Enzymreaktion nullter Ordnung.

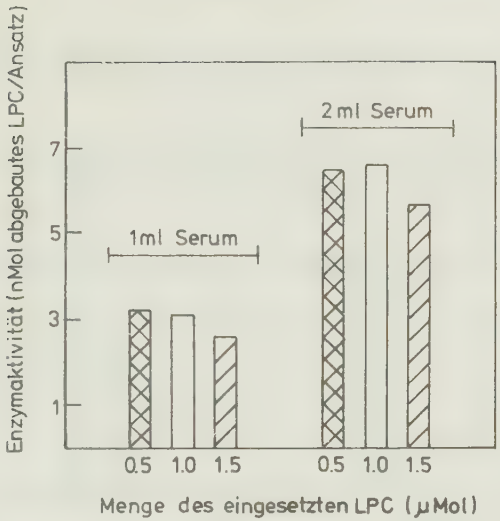

Abb. 11 Abhängigkeit des Lysophosphatidylcholinabbaues von Enzym- und Substratmengen.

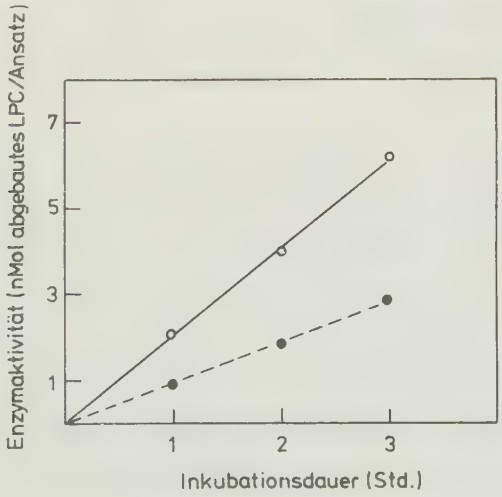

Abb. 12 Kinetik des Abbaues von Lysophosphatidylcholin während der Inkubation von ultrazentrifugiertem Humanserum. (o——o) Die Abbaurate von LPC bei der Inkubation von 2 ml Serum. (●——●) Die Abbaurate von LPC bei der Inkubation von 1 ml Serum.

3.4. Anreicherung der Lysophospholipaseaktivität des Humanserums

3.4.1. Bestimmung der enzymatischen Aktivität in den mittels Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen ZZ und U

Da sich im Nativserum endogene Substrate befinden, welche durch die enzymatische Reaktion mit LCAT Lysophosphatidylcholin bilden könnten, wurde lipoproteinfreies Serum verwendet. Dadurch kann man eine genaue Bestimmung des Abbaues des eingesetzten Substrates bzw. der Zunahme an freien Fettsäuren erzielen.

Mischserum wurde mit KBr auf eine Dichte von 1,21 g/ml eingestellt und 36 Stunden bei 318 000 x g zentrifugiert. Der Inhalt der Zentrifugationsröhrchen wurde von oben nach unten in folgende Fraktionen unterteilt:

(0,5 ml) GLP = Gesamtlipoproteine

(4,0 ml) ZZ = Zwischenzone

(5,5 ml) U = Unterstand

Die sich entsprechenden Fraktionen mehrerer Röhrchen wurden gesammelt, wenn nötig eingeengt, und anschließend gegen 0,02 M Phosphatpuffer (pH=7,4) dialysiert. Aus der Zwischenzone ZZ und dem Unterstand U wurden Inkubationsansätze und Kontrollansätze hergestellt, die Soj-LPC als Substrat enthielten. Soj-LPC wurde in einer Konzentration von 1 μMol/ml eingesetzt. Die Zunahme an freigesetzten Fettsäuren wurde nach 3 Stunden Inkubationszeit bestimmt. Um die Aktivität der verschiedenen Fraktionen vergleichen zu können, wurde die spezifische Aktivität als Maß zum Vergleich herangezogen. Diese spezifische Aktivität bezeichnet die Anzahl der Aktivitätseinheiten/mg Enzym-Protein. In dieser Arbeit wird die spezifische Aktivität folgendermaßen ermittelt:

(pMol freigesetzte Fettsäure)x(mg Proteine)$^{-1}$ x (Inkubationsdauer in Minuten)$^{-1}$.

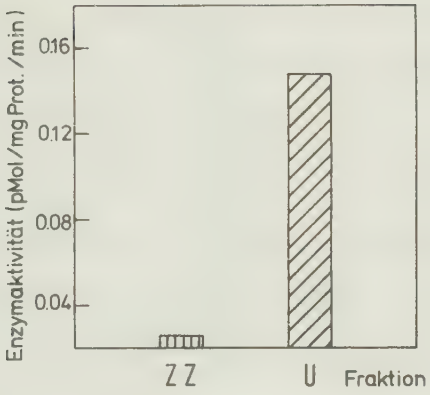

Abb. 13 Die Lysophospholipase-Aktivität in den mittels Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen ▨ U = Unterstand, und ▥ ZZ = Zwischenzone

Ergebnis:

Während für die Fraktion U eine sehr deutliche Aktivität nachgewiesen wurde, zeigte die Fraktion ZZ eine sehr geringe Aktivität.

Die spezifische Lysophospholipase-Aktivität von ultrazentrifugiertem Serum beträgt 0,128 pMol x mg Prot.$^{-1}$ x min^{-1}. Dieser Wert dient als Bezugsgröße für die Berechnung der Anreicherungsfaktoren in den folgenden Versuchen.

Die Fraktion U dient als Ausgangssubstanz für die weiteren Anreicherungsschritte der Serum-Lysophospholipase.

3.4.2. Bestimmung der enzymatischen Aktivität in der durch Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Serumfraktionen

Die ultrazentrifugierte Serumfraktion U wurde durch weitere Fraktionierung mit Ammoniumsulfat angereichert. Die erste Fraktion N_1 enthält die Proteine, die bei einer Ammoniumsulfatkonzentration bis 28% ausgefällt wurden. Die zweite Fraktion N_2 enthält die bei einer Ammoniumsulfatkonzentration zwischen 28% und 55% ausgefällten Proteine. Die dritte Fraktion N_3 enthält alle bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 55% noch nicht ausgefällten Proteine.
Die drei Fraktionen wurden zunächst eingeengt und dann gegen Phosphatpuffer (0,02 M; pH=7,4) dialysiert. Inkubations- und Kontrollansätze aus den drei Fraktionen wurden hergestellt. Soj-LPC in Konzentration von 1 µMol/ml wurde als Substrat verwendet, die Inkubationsdauer betrug 3 Stunden. Die Enzymaktivität wurde durch quantitative Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren mittels GLC ermittelt. Der Proteingehalt jeder Fraktion wurde bestimmt und dadurch die spezifische Aktivität aller Fraktionen berechnet.

Ergebnis:

Die spezifische Aktivität aller drei durch Ammoniumsulfatfällung aus Serumfraktion U gewonnenen Fraktionen ist in Abb. 14 dargestellt. Von den drei erhaltenen Fraktionen weist die Fraktion N_2 die höchste Lysophospholipase-Aktivität auf. Die spezifische Aktivität dieser Fraktion beträgt 0,293 pMol x mg Prot.$^{-1}$ x min^{-1}. So wurde durch Ammoniumsulfatfällung eine Anreicherung des Enzyms in der Fraktion N_2 um den Faktor 2,3 gegenüber ultrazentrifugiertem Serum erreicht. Fraktion N_2 wird deshalb für die weiteren Versuche zur Anreicherung des Enzyms verwendet.

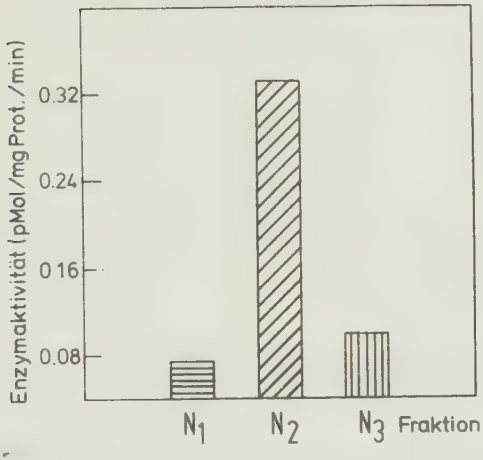

Abb. 14 Lysophospholipase-Aktivität in den drei durch Ammoniumsulfatfällung aus Serumfraktion U gewonnenen Fraktionen

3.4.3. Anionenaustauschchromatographie der durch Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Fraktion N_2

Die mittels Ammoniumsulfatfällung erhaltene Fraktion N_2 wurde durch Anionenaustauschchromatographie an einer DEAE-Sephadex-A-50-Säule (Gel-Länge 35 cm und Durchmesser 3 cm) in die Fraktionen F_1 bis F_6 aufgetrennt (Abb. 15). Die Fraktion F_1 wurde gewonnen durch Abwaschen der Säule mit Startpuffer (0,02 M Phosphatpuffer; pH=7,4). Sie enthält somit alle nicht an den Anionenaustauscher adsorbierten Proteine. Die Fraktion F_2 bis F_6 konnten erst nach Anlegen eines Phosphatpuffergradienten mit kontinuierlich steigender Molarität erhalten werden. Die Extinktion des Eluats wurde bei 254 nm gemessen und als Kurve (Abb. 15) aufgezeichnet. Die spezifische Aktivität aller erhaltenen Fraktionen F_1 bis F_6 wurde wie üblich berechnet.

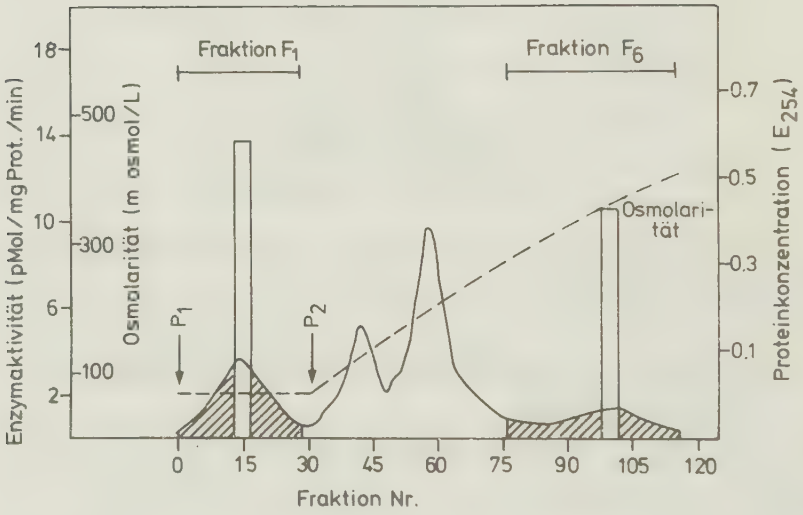

Abb. 15 Elutionskurve bei Auftrennung von Fraktion N_2 durch Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex-A-50-Säule, mit der Änderung der Osmolarität in den Eluatröhrchen nach Anlegen des Gradienten, sowie der spezifischen Enzymaktivitäten in den Fraktionen F_1 bis F_6.

Ergebnis:

Angereicherte Lysophospholipase-Aktivität ist fast nur in den Fraktionen F_1 und F_6 zu finden. In den Fraktionen F_2 bis F_5 ist keine oder sehr geringe Lysophospholipase-Aktivität vorhanden.

Gegenüber ultrazentrifugiertem Serum ist die Anreicherung der Fraktion F_1 107-fach, für die Fraktion F_6 nur 83-fach.

Die spezifische Lysophospholipase-Aktivität von F_1 und F_6 ist in Abb. 15 eingezeichnet.

3.4.4. Auftrennung der Fraktion F_1 durch Affinitätschromatographie auf einer Concanavalin-A-Sepharose-Säule

Zur weiteren Reinigung der durch Anionenaustauschchromatographie in Versuch Nr. 3.4.3. gewonnenen Fraktion F_1 wurde diese Fraktion auf eine Con-A-Sepharose-Säule (Gel-Länge 25 cm; Durchmesser 2 cm) aufgetrennt.

Mit Puffer I (0,1 M Acetatpuffer mit 1M NaCl, 10^{-3} M $MgCl_2$, 10^{-3} M $MnCl_2$, pH=6,0) wurde die Fraktion der nicht an das Säulenmaterial gebundenen Proteine eluiert. Die erhaltene Fraktion wurde als C_1 bezeichnet.

Mit Puffer II (gleiche Zusammensetzung wie Puffer I, jedoch mit einem Zusatz von 0,1 M Methyl α-D-mannopyranosid) wurde die glykoproteinreiche Fraktion C_2 gewonnen. Die Fraktionen C_1 und C_2 wurden eingeengt, gegen Phosphatpuffer (0,02 M; pH=7,4) dialysiert und anschließend auf ihre Lysophospholipase-Aktivität ausgetestet.

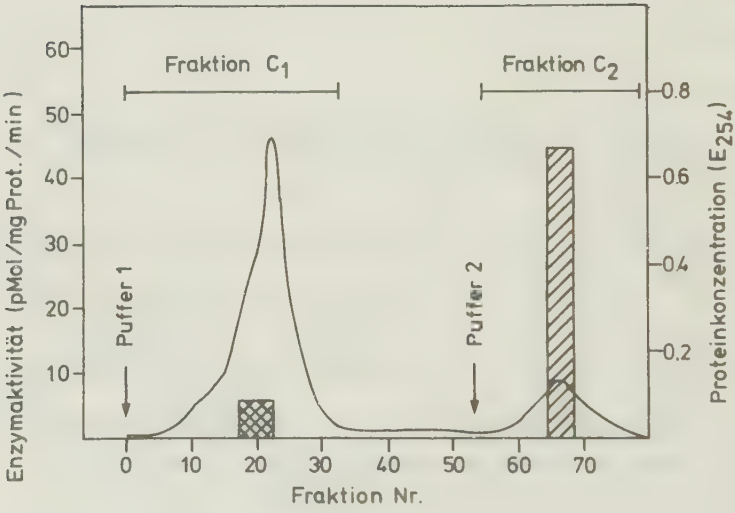

Abb. 16 Elutionskurve der Auftrennung von Fraktion F_1 mittels Affinitätschromatographie auf der Concanavalin-A-Sepharose-Säule, mit den spezifischen Aktivitäten von C_1 und C_2.

Ergebnis:

Die Lysophospholipase-Aktivität der Fraktion F_1 wurde mittels Affinitätschromatographie auf der Con A-Sepharose-Säule in Fraktion C_2 angereichert. Die spezifische Lysophospholipase-Aktivität der Fraktion C_2 beträgt 43,9 pMol x mg Prot.$^{-1}$ x min^{-1}. Gegenüber ultrazentrifugiertem Serum ist die Fraktion C_2 340-fach angereichert.
Um sinnvolle weitere Schritte für die weitere Enzymanreicherung aus der Fraktion C_2 festzulegen, wurde zunächst eine immunologische Untersuchung der C_2 enthaltenen Proteine durchgeführt.

3.4.5. Versuche zur immunologischen Charakterisierung der Proteine der Fraktion C_2 mittels radialer Immundiffusion nach Ouchterlony

Von unserer Arbeitsgruppe (110) wurde eine immunologische Charakterisierung der lysophospholipasehaltigen Fraktion C_2 mittels radialer Immundiffusion nach Ouchterlony (89) durchgeführt. Diese bedeutet zunächst eine Doppeldiffusion der Fraktion C_2 gegen spezifisches Anti-Human-IgG-Serum vom Kaninchen sowie gegen Gesamt-Anti-Human-Serum vom Kaninchen.
Diese Untersuchungen zeigten, daß in der Fraktion C_2 vorwiegend Immunglobuline der IgG-Klasse vorhanden sind. Zu einem weiteren Schritt dieser Untersuchung wurde die Fraktion C_2 gegen IgG-Subklassen spezifische (Anti-Human IgG_1, Anti-Human IgG_2, Anti-Human-IgG_3 und Anti-Human IgG_4) ausgetestet. Diese Doppel-Immundiffusion ergab, daß Fraktion C_2 Immunglobuline der Unterklassen IgG_1, IgG_2 und IgG_3 enthält.
Aufgrund dieser Ergebnisse erschien es sinnvoll, durch Affinitätschromatographie auf einer Protein A-Sepharose-Säule, eine IgG_3-haltige Fraktion von einer IgG_1- und IgG_2-haltigen Fraktion zu trennen und dadurch eine weitere Anreicherung der Lysophospholipase-Aktivität in einer der beiden Fraktionen zu erzielen.

3.4.6. Auftrennung der Fraktion C_2 mittels Affinitätschromatographie auf der Protein-A-Sepharose-Säule

Die Fraktion C_2 wurde zuerst auf 5 ml eingeengt, gegen 0,1 M Phosphatpuffer (pH=7,1) dialysiert und dann auf die äquilibrierte Protein-A-Sepharose-Säule (Gel-Länge 7 cm; Durchmesser 1 cm) aufgetragen.
Die nicht an das Säulenmaterial gebundenen Immunglobuline der Unterklasse IgG_3 wurden mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH=7,1) eluiert und die so gewonnene Fraktion mit P_1 bezeichnet. Die an das Säulenmaterial gebundenen Immunglobuline der Unterklassen IgG_1 und IgG_2 wurden als zweite Fraktion P_2 mit 0,1 M Glycin-HCl-Puffer (pH=3,0) gewonnen. Die erhaltenen Fraktionen P_1 und P_2 wurden eingeengt, gegen Phosphatpuffer (0,02 M; pH=7,4) dialysiert und auf ihre Lysophospholipase-Aktivität ausgetestet.

Ergebnis:

Bei diesem Reinigungsschritt wurde die Aktivität in die Fraktion P_1 (Abb. 17) nachgewiesen. Durch die Affinitätschromatographie auf der Protein-A-Sepharose-Säule wurden mit der Fraktion P_2 etwa 60-70% der in C_2 noch erhaltenen Proteine als Verunreinigung von der enzymhaltigen Fraktion P_1 getrennt.
Die spezifische Lysophospholipase-Aktivität der Fraktion P_1 beträgt 244 pMol x mg Prot.$^{-1}$ x min^{-1}. Die Anreicherung nach diesem Schritt beträgt für die Fraktion P_1 1900-fach gegenüber ultrazentrifugiertem Serum. Diese Ergebnisse ließen zu, daß die Lysophospholipase-Aktivität nicht zur IgG-Klasse gehört, sondern daß vielmehr das IgG als Hauptverunreinigung anzusehen ist. Deshalb wurde eine weitere Reinigung des Enzyms durch Immunadsorptionschromatographie durchgeführt.

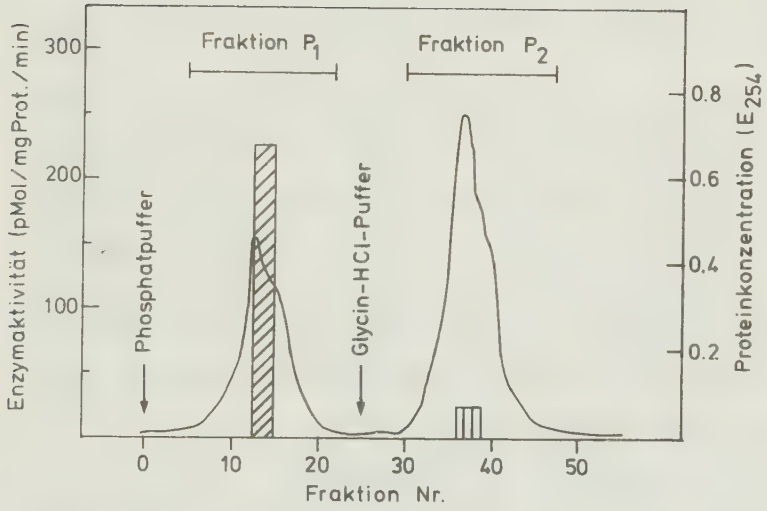

Abb. 17 Elutionskurve der Auftrennung von Fraktion C_2 durch Affinitätschromatographie auf der Protein-A-Sepharose-Säule, mit den spezifischen Enzymaktivitäten der Fraktionen P_1 und P_2.

3.4.7. Weitere Reinigung der Fraktion P_1 durch Immunadsorptionschromatographie

Durch Immunadsorptionschromatographie wurde versucht, die in der Fraktion P_1 erhaltene Lysophospholipase von verunreinigenden Immunglobulinen der IgG-Klasse zu befreien. Dabei sollten die in der Fraktion P_1 neben dem Enzym vorhandenen Immunglobuline der IgG_3-Unterklasse an die Säule gebunden werden, während die gereinigte Lysophospholipase im Eluat erscheinen sollte.

Bei der Herstellung des Säulenmaterials war zu beachten, daß in dem dazu verwendeten Antiserum nur Antikörper gegen IgG, nicht jedoch gegen die Lysophospholipase selbst, enthalten sein durften. Um dies sicherzustellen, wurde als Antiserum nicht Anti-Human IgG verwendet, sondern Anti-Human-Kappa-L-Ketten-Gammglobulin und Anti-Human-Lambda-L-Ketten-Gammaglobulin. Die theoretische Durchführbarkeit der Immunadsorptionschromatographie unter Verwendung der Anti-Human-L-Ketten-Gammaglobuline als Antiserum wurde von Scherer et al (110) getestet.

Die Fraktion P_1 wurde auf 1 ml eingeengt und auf die Immunadsorptionschromatographie-Säule (Gel-Länge 26 cm; Durchmesser 1,4 cm) aufgetragen.

Die Fraktion der nicht an das Säulenmaterial gebundenen Proteine wurde mit 0,1 M Bicarbonatpuffer (pH=8,0) eluiert. Diese Fraktion wurde als LP_1 bezeichnet. Die Elution der an das Säulenmaterial adsorbierten Immunglobuline der IgG_3-Klasse wurde mit 0,1 M Essigsäure (pH=2,9) ohne Erfolg versucht. Die Fraktion LP_1 wurde eingeengt, gegen 0,02 M Phosphatpuffer (pH=7,4) dialysiert und auf ihre Lysophospholipase-Aktivität ausgetestet.

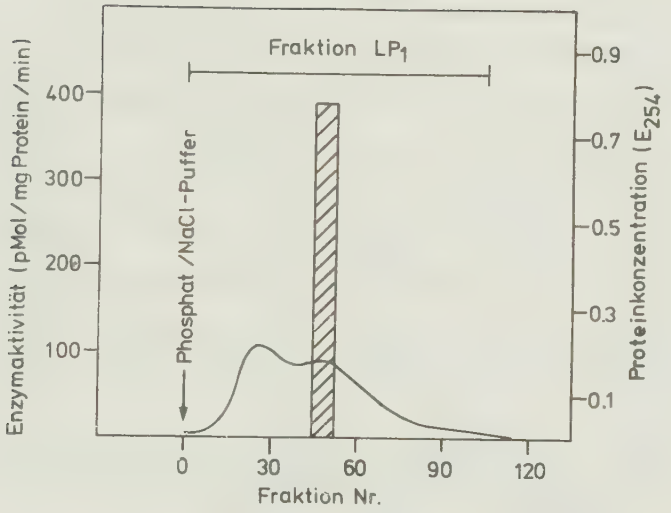

Abb. 18 Elutionsdiagramm der Reinigung von Fraktion P_1 auf der Immunadsorptionschromatographie-Säule, mit der spezifischen Lysophospholipase-Aktivität von LP_1.

Ergebnis:

Durch die Immunadsorptionschromatographie wird die in der Fraktion LP_1 enthaltene Lysophospholipase von verunreinigenden Immunglobulinen der IgG-Klasse gereinigt. Die spezifische Lysophospholipase-Aktivität dieser Fraktion ist in Abb. 18 eingezeichnet. Durch diesen Reinigungsschritt wurde eine Anreicherung gegenüber dem Ausgangsserum um den Faktor 3000 erzielt. Man könnte auf den Anreicherungsschritt durch Protein-A-Sepharose-Chromatographie verzichten und die Fraktion C_2 direkt mittels der Immunadsorptionschromatographie von verunreinigenden Immunglobulinen der IgG-Klasse befreien. Allerdings konnten durch die geringe Proteinbindungskapazität der Immunasorptionschromatographie-Säule (84) nur relativ kleine Mengen des hochgereinigten Enzyms dargestellt werden. Durch die Zwischenstufe des vorherigen Auftrennens von C_2 auf der Protein-A-Sepharose-Säule kann die Ausbeute an hochgereinigter Lysophospholipase bei der Immunadsorptionssäule erhöht werden.

3.4.8. Versuch zur weiteren Anreicherung der Fraktion LP_1 durch Säulenchromatographie mit aktiver Thiol-Sepharose

Die Fraktion LP_1 wurde durch eine Thiol-Sepharose-aktivierte-Säule aufgetrennt. Durch Elution mit Startpuffer (0,02 M Phosphatpuffer mit 0,25 M NaCl und 10^{-3} M EDTA, pH=7,4) wurde die Fraktion der nicht an die aktivierte Thiol-Sepharose gebundenen SH-gruppenfreien Proteine (Fraktion T_1) eluiert.

Die Fraktion der an das Säulenmaterial gebundenen SH-gruppenhaltigen Proteine (Fraktion T_2) wurde gewonnen, indem die Säule mit Reduktionspuffer (Startpuffer mit 10^{-2} M L-Cystein) durchgespült wurde. Beide Fraktionen wurden eingeengt und nach einer Dialyse gegen 0,02 M Phosphatpuffer (pH=7,4) auf ihre Lysophospholipase-Aktivität hin ausgetestet.

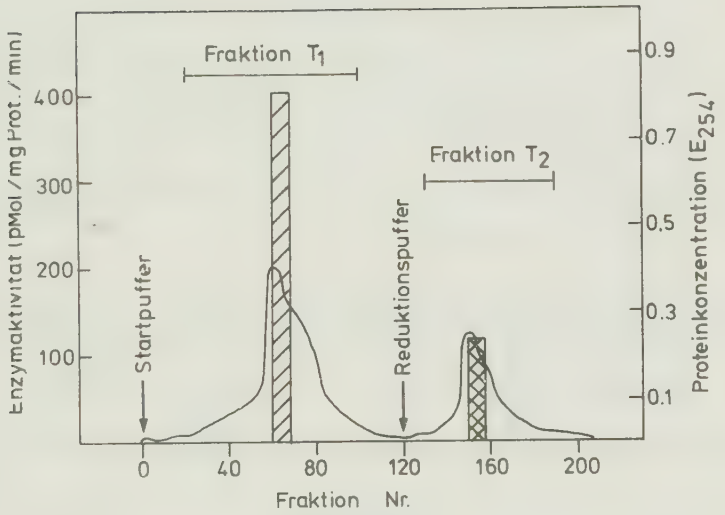

Abb. 19 Auftrennung der Fraktion LP_1 durch kovalente Chromatographie auf der Thiol-Sepharose-Säule, mit der spezifischen Aktivität der Fraktionen T_1 und T_2.

Ergebnis:

Die Lysophospholipase-Aktivität wurde hauptsächlich in der Fraktion T_1 gefunden, während die Fraktion T_2 nur 30% der spezifischen Aktivität von LP_1 enthält. Die spezifische Lysophospholipase-Aktivität in T_1 beträgt 410 pMol x mg Prot.$^{-1}$ x min^{-1}.

Da das Enzym nicht an das Säulenmaterial gebunden wurde, konnte mit diesem Schritt keine wesentliche Verbesserung des Anreicherungsgrades erzielt werden. Als Ursache für die unzureichende Bindung an die Thiol-Sepharose kommt möglicherweise in Frage, daß die SH-Gruppen des Enzyms nicht an der Oberfläche des Proteins liegen, so daß eine sterische Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial verhindert wird.

Daher wurde in den folgenden Versuchsreihen zur Charakterisierung des Enzyms die Fraktion LP_1 herangezogen.

3.4.9. Reinigung der lysophospholipasehaltigen Fraktion F_6 durch Affinitätschromatographie auf einer Concanavalin-A-Sepharose-Säule

Hierbei wurde versucht, die zweite durch Anionenaustauschchromatographie aus Humanserum gewonnene lysophospholipasehaltige Fraktion F_6 weiter zu reinigen.

Zunächst wurde die Fraktion F_6 gegen 0,02 M Phosphatpuffer (pH=7,4) dialysiert und anschließend auf der äquilibrierten Concanavalin-A-Sepharose-Säule (Gel-Länge 20 cm; Durchmesser 2 cm) aufgetrennt. Durch Puffer I (0,1 M Acetatpuffer mit 1 M NaCl, 10^{-3} M $CaCl_2$, 10^{-3} M $MgCl_2$, 10^{-3} M $MnCl_2$, pH=6,0) wurden die nicht an das Säulenmaterial gebundenen Proteine (Fraktion C_1^*) eluiert. Durch Puffer II (gleiche Zusammensetzung wie Puffer I mit Zusatz von 0,1 M Methyl-α-D-mannopyranosid) wurde die Fraktion LP_2 gewonnen. Die Lysophospholipase-Aktivität beider Fraktionen wurde, wie vorstehend beschrieben, ausgetestet.

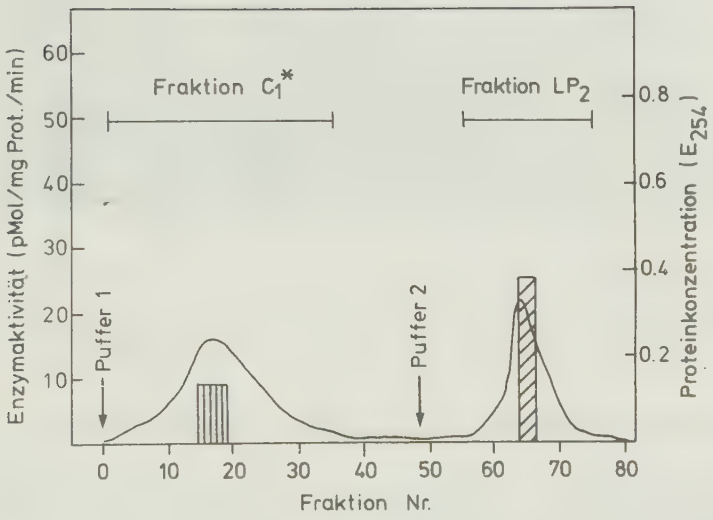

Abb. 20 Elutionskurve der Auftrennung von Fraktion F_6 auf der Concanavalin-A-Sepharose-Säule, mit der spezifischen Lysophospholipase-Aktivitäten der Fraktionen C_1^* und LP_2.

Ergebnis:

Eine höhere Lysophospholipase-Aktivität ließ sich in der zweiten Fraktion LP_2 nachweisen (Abb. 20). Die spezifische Aktivität der Lysophospholipase von LP_2 beträgt 25,7 pMol x mg Prot.$^{-1}$ x min^{-1}. Im Vergleich zur Aktivität des ultrazentrifugierten Serums erreicht diese Fraktion eine Anreicherung um den Faktor 200.

3.4.10. Immunologische Charakterisierung der Fraktion LP_2-Proteine mittels radialer Immundiffusion nach Ouchterlony

Eine radiale Immundiffusion von LP_2 wurde in unserem Labor (110) gegen die spezifischen Antiseren: Anti-Human-Coeruloplasmin, Anti-Human-α_1-saures-Glykoprotein, Anti-Human-α_2-Makroglobulin, Anti-Human-IgA, Anti-Human-IgM und Anti-Human-Albumin durchgeführt. Dabei läßt sich feststellen, daß in dieser Fraktion Coeruloplasmin, α_2-Makroglobulin, IgA, IgM und Albumin enthalten ist.

3.5. Überprüfung der Reinheit und Homogenität des Enzympräparates LP_1

Zur Bestimmung der Reinheit und Homogenität des Enzympräparates LP_1 wurde das Verfahren der isoelektrischen Fokussierung angewandt. Bei diesem Verfahren werden Proteine in einem elektrischen Feld mittels pH-Gradienten aufgrund ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte getrennt. Es findet zunächst eine elektrophoretische Wanderung im pH-Gradienten statt, bis das Molekül eine Zone erreicht, wo der pH-Wert dessen isoelektrischem Punkt entspricht. In dieser Zone erfolgte daher eine Konzentrierung des Proteins.

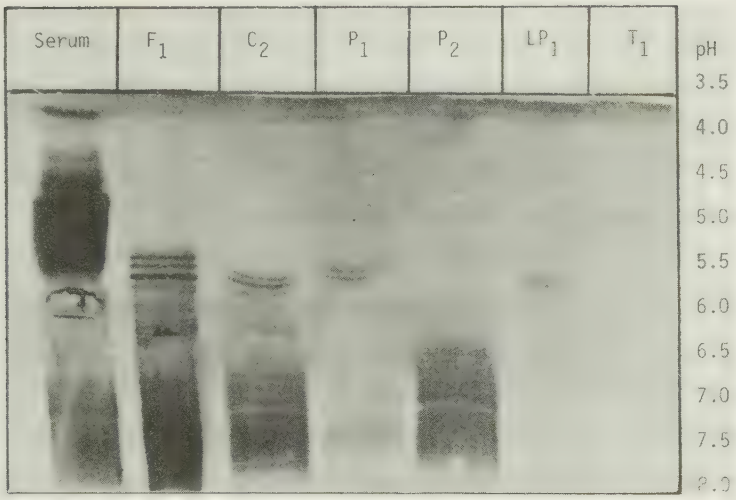

Abb. 21 Auftrennung des ultrazentrifugierten Serums und der enzymhaltigen Fraktionen mittels isoelektrischer Fokussierung auf eine Polyacrylamid-Gel-Platte.

Ergebnis:

Die isoelektrophoretische Trennung der verschiedenen enzymhaltigen Fraktionen ist in Abb. 21 dargestellt. Dabei ist zu ersehen, daß die Auftrennung der Fraktion LP_1 nur noch einzelne Proteinbanden im Bereich von pH 5.5 ergibt. Welche dieser Banden jedoch des Enzyms darstellt, konnte nicht untersucht werden, da nach dem isoelektrischen Fokussieren bei der Elution keine Enzymaktivität nachweisbar war, das heißt, daß das Enzym beim isoelektrischen Fokussieren inaktiviert wurde.

3.6. Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelfiltration auf Sephadex-G-200

Die Sephadex-G-200-Säule wurde mit 0,05 Tris/HCl-Puffer mit 0,1 M KCl (pH=7,5) äquilibriert. Die Säulenabmessungen waren 90 cm Länge und 3 cm Durchmesser. Als Eichproteine wurden verwendet: Cytochrom C (aus Pferdeherz), Ovalbumin, Rinderserumalbumin, α-Amylase (aus B. Subtilis), Katalase (aus Rinderleber) und Katalase (aus Bakterien).

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde auf semilogarithmischem Papier das relative Elutionsvolumen (Ve/Vo) gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen.

Das Molekulargewicht des Enzympräparates LP_1 betrug nach dieser Methode 135 000 (Abb. 22). Dieser Wert ist der Mittelwert von drei Versuchen.

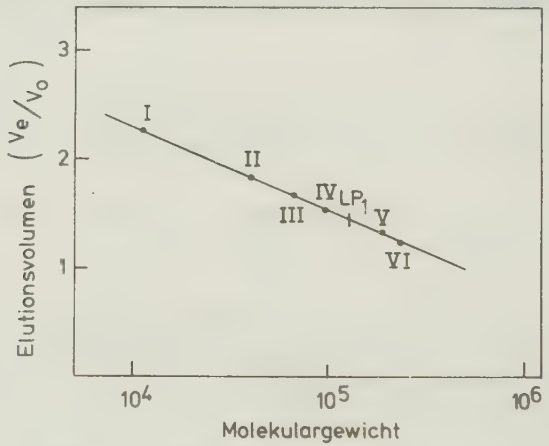

Abb. 22 Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration mit Sephadex-G-200.
I = Cytochrom C, II = Ovalbumin, III = BSA,
IV = α-Amylase, V = Katalase (aus Rinderleber),
VI = Katalase (aus Bakterien).

3.7. Untersuchungen zur Charakterisierung des Enzympräparates LP_1

3.7.1. Substratspezifität

Bei der Charakterisierung der enzymatischen Aktivität wurde zunächst auf die Substratspezifität des Enzyms eingegangen. Hierbei wurde untersucht, ob das Enzympräparat LP_1 lediglich Lysophosphatidylcholin angreift oder neben Lysophosphatidylcholin auch andere Substrate abbauen kann. Zu diesem Zweck wurden neben Soj-Lysophosphatidylcholin die Substrate Soj-Phosphatidylcholin, Soj-Lysophosphatidyläthanolamin, Soj-Phosphatidyläthanolamin, Serum-Lysophosphatidylcholin und Serum-Phosphatidylcholin gewählt. Die Herstellung der Substralösungen erfolgte durch Auflösung jeweils gleicher Mengen der Substanzen LPC, PC, LPE und PE in jeweils gleichen Volumina von Phosphatpuffer (0,02 M; pH=7,4). Je Ansatz wurde jeweils 1 µMol an Substrat verwendet. Das gereinigte Enzympräparat LP_1 wurde gegen Phosphatpuffer (0,02 M; pH=7,4) dialysiert.

Inkubationsansätze, wie auch Kontrollansätze wurden hergestellt, wobei das Reaktionsvolumen 3 ml war. Die Inkubation dauerte 3 Stunden bei $37^{o}C$. Die enzymatische Aktivität wurde durch Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren mittels Gaschromatographie ermittelt. Sowohl die gesamten freigesetzten Fettsäuren, wie auch die einzelnen Fettsäuren wurden in diesem Versuch betrachtet.

In einem parallelen Versuch wurde die Entstehung von Lysophosphatidylcholin bzw. Lysophosphatidyläthanolamin als Folge des enzymatischen Abbaues von PC bzw. PE ermittelt. Dazu wurden Proben mit den Substraten PC bzw. PE nach der Inkubation friergetrocknet, die Lipide extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

Tab. 8 Die getesteten Aktivitäten von LP_1 beim enzymatischen Abbau unterschiedlicher Substrate.

Substrate	Getestete Aktivität von LP_1 (pMol/mg Prot./min)
Soj - Lysophosphatidylcholin	334
Soj - Phosphatidylcholin	61
Soj - Lysophosphatidyläthanolamin	164
Soj - Phosphatidyläthanolamin	43
Serum - Lysophosphatidylcholin	248
Serum - Phosphatidylcholin	32

Ergebnis:

Aus Tab. 8 ist zu ersehen, daß durch das Enzympräparat LP_1 nicht nur LPC sondern auch PC, LPE und PE deacyliert werden. Allerdings werden die Substrate unterschiedlich stark abgebaut. Am stärksten wird LPC von dem Enzym angegriffen, an zweiter Stelle folgt dann LPE. Die spezifischen Aktivitäten gegenüber PC und PE sind annähernd gleich und erreichen etwa 20% der spezifischen Lysophosphatidylcholinase-Aktivität.
Das deutet auf eine unspezifische enzymatische Phospholipase-Aktivität hin, wenn auch mit einer vorherrschenden Lysophospholipase-Aktivität.
Die prozentuelle Verteilung der einzelnen durch enzymatische Einwirkung freigesetzten Fettsäuren ist in Abb. 23 graphisch dargestellt.

Im Falle des enzymatischen Abbaues von PC und PE ist eine Entstehung von LPC oder LPE als Zwischenstoffe des Abbaues ausgeschlossen. Das bedeutet, daß diese Substrate vollständig deacyliert werden.

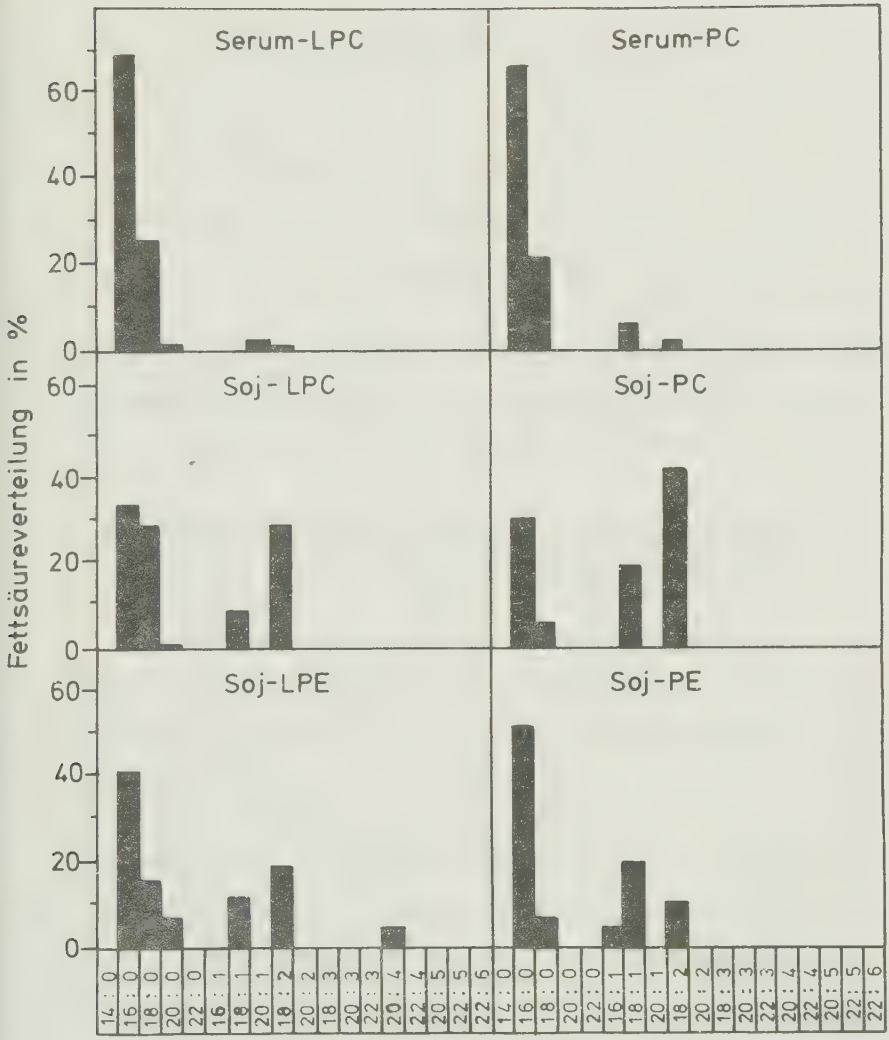

Abb. 23 Prozentuelle Verteilung der durch enzymatische Aktivität freigesetzte Fettsäuren aus den Substraten: Soj-LPC, -PC, -LPE, -PE, Serum-LPC und -PC.

3.7.2. Fettsäurespezifität

Mittels Gas-Flüssig-Chromatographie kann man nicht nur sämtliche durch enzymatische Wirkung freigesetzten Fettsäuren untersuchen, sondern auch die einzelnen Fettsäuren des Substrates vor dem enzymatischen Abbau. Dadurch kann die Fettsäurespezifität des Enzyms ermittelt werden. Zu diesem Versuch wurden Substrate aus Sojabohnen und aus Serum verwendet. Zunächst wurde die Fettsäurezusammensetzung dieser Substrate durch eine Totalhydrolyse dargestellt.
Um die quantitative Fettsäurespezifität zu erfassen, wurde das Verhältnis zwischen spezifischen Fettsäuren, die enzymatisch freigesetzt wurden, und spezifischen Fettsäuren, die das Substrat enthielten, bestimmt.

3.7.2.1. Gaschromatographische Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Sojabohnen- und Serumsubstraten

Die Gesamtmenge der Fettsäuren und der Gehalt an einzelnen Fettsäuren in den Substraten: Soj-LPC, Soj-LPE, Soj-PC, Soj-PE, Serum-LPC und Serum-PC wurden gaschromatographisch dargestellt. Zuerst wurden diese Substrate hydrolysiert und die freigesetzten Fettsäuren aus dem Hydrolysat extrahiert, verestert und anschließend mittels Gas-Flüssig-Chromatographie bestimmt. Die Hydrolyse von gleichen Mengen der verschiedenen Substrate wurde, wie in Versuch Nr. 2.20. beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 wiedergegeben und graphisch in Abb. 24 dargestellt.

Ergebnis:

Die Zusammensetzung der Fettsäuren in den einzelnen Phosphatiden (Tab. 9) zeigt, daß die Serumphosphatide reich an gesättigten Fettsäuren, die Sojabohnenphosphatiden hingegen reich an ungesättigten Fettsäuren sind.

Tab. 9 Prozentuelle Zusammensetzung der Fettsäuren der verschiedenen untersuchten Substrate

Substrate \ Fettsäure	14:0	16:0	18:0	20:0	16:1	18:1	20:1	18:2	18:3	20:4	X+)
Soj-LPC	0,70	24,35	16,74	0,58	-	12,73	1,52	32,52	-	-	9,68
Serum-LPC	1,20	53,97	13,86	0,42	0,20	2,71	5,72	9,61	0,32	3,40	8,59
Soj-PC	0,65	15,36	3,85	16,05	-	13,26	-	48,70	0,35	-	1,78
Serum-PC	0,40	32,27	13,95	0,38	0,96	15,79	0,13	16,86	0,70	11,70	6,86
Soj-PE	0,28	22,37	5,80	1,10	0,12	14,32	0,53	34,43	0,26	17,94	2,85
Soj-LPE	0,92	18,70	16,95	1,20	-	7,98	0,80	18,32	0,34	26,05	8,74

X+) = nicht identifizierte Fettsäure

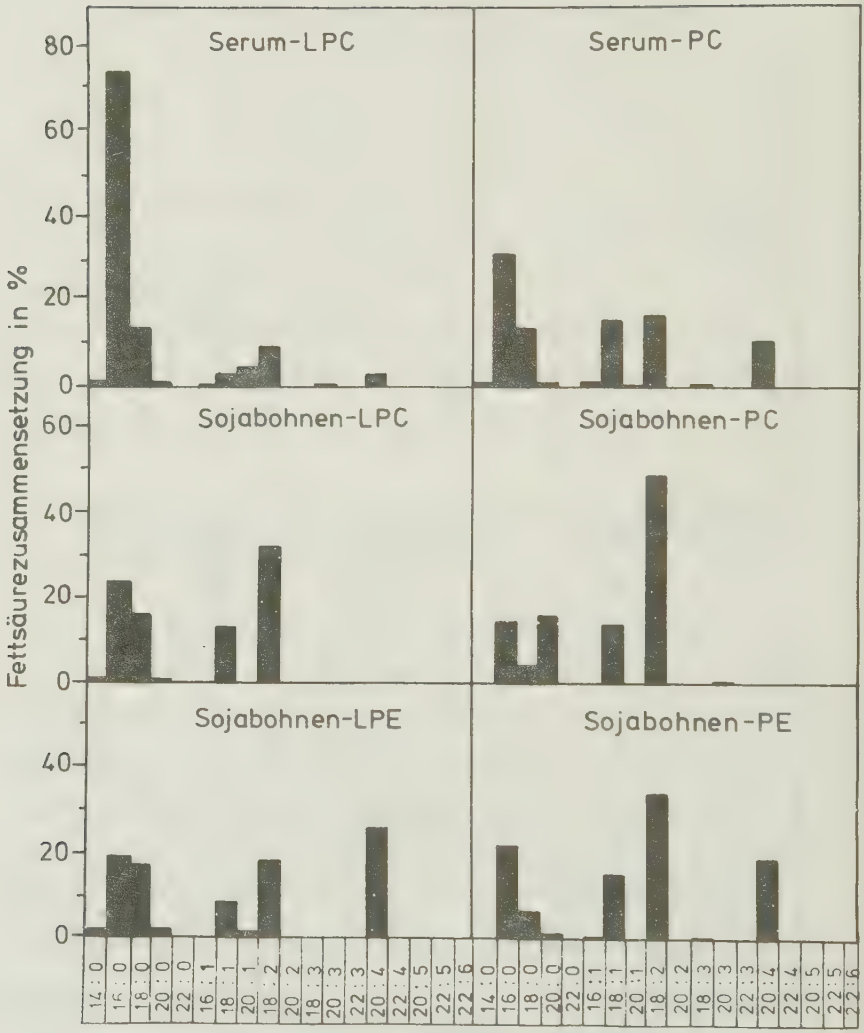

Abb. 24 Prozentuelle Zusammensetzung der Fettsäuren der verschiedenen Phosphoglyceride und Lysophospho-glyceride aus Serum und Sojabohnen.

3.7.2.2. Ermittlung der Fettsäurespezifität des Enzympräparates

Die Ergebnisse der Versuche 3.8.1. und 3.8.2 erlauben einen Vergleich der Fettsäureverteilung nach enzymatischer Inkubation mit der Fettsäureverteilung nach totaler Hydrolyse von Substraten.
Bei einem gleichmäßigen enzymatiachen Abbau ohne Bevorzugung bestimmter Fettsäuren sollte das prozentuale Verhältnis von enzymatisch freigesetzten Fettsäuren zu den Fettsäuren, die aus dem Substrat bei Totalhydrolyse freigesetzt werden, gleich 1 sein. Werden bestimmte Fettsäuren bevorzugt beim enzymatischen Abbau freigesetzt, so ist zu erwarten, daß das Verhältnis größer als 1 ist. Ist das Verhältnis für bestimmte Fettsäuren dagegen kleiner als 1, so kann man daruas schließen, daß Substrate,die diese Fettsäuren enthalten, weniger gut umgesetzt werden.

Tab. 10 Fettsäurespezifität der Lysophospholipase LP_1: Die Daten entsprechen dem Verhältnis von enzymatisch freigesetzten Fettsäuren gegenüber denjenigen, die aus dem Substrat bei Totalhydrolyse freigesetzt werden.

Fettsäure		(% FS enzym./ % FS hydrol.) Serum-LPC	Soj-LPC
Palmitinsäure	(16:0)	1,27	1,41
Stearinsäure	(18:0)	1,86	1,75
Ölsäure	(18:1)	0,67	0,72
Linolsäure	(18:2)	0,13	0,87

Ergebnis:

Aus Tab. 10 zeigt sich deutlich, daß LPC mit einer gesättigten Fettsäure bevorzugt gegenüber LPC mit einer einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäure abgebaut wird.

3.7.3. Vergleichende Austestung der Phospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1 gegenüber vier verschiedenen Substraten unter Verwendung von verschiedenen Puffern des gleichen pH-Wertes

Das Enzympräparat LP_1 wurde in jeweils gleichen Mengen gegen folgende Puffer 24 Stunden lang dialysiert:

Puffer Nr. 1: Phosphatpuffer (0,02 M; pH=7,4),

Puffer Nr. 2: Phosphatgepufferte physiologische NaCl-Lösung (0,02 M; pH=7,4),

Puffer Nr. 3: Tris/HCl-Puffer(0,02 M; pH=7,4),

Puffer Nr. 4: NaCl/EDTA-Puffer (0,02 M; pH=7,4).

Als Substrate wurden Soj-LPC, Soj-PC, Soj-LPE und Soj-PE verwendet, die jeweils in einem der vier oben angegebenen Puffer aufgelöst wurden. Je Ansatz wurde 1 µMol des jeweiligen Substrates verwendet. Als Kontrollansätze dienten lediglich in Puffer gelöste Substrate, die ebenso wie die Substrat-Enzym-Ansätze behandelt wurden. Die Ansätze wurden bei 37°C für 3 Stunden inkubiert.

Tab. 11 Spezifische Aktivitäten des Enzympräparates LP_1 für die verschiedenen untersuchten Substrate in unterschiedlichen Pufferlösungen.

Verwendete Pufferlösung (0,02 M; pH=7,4	Spezifische Aktivität (pMol/mg Prot./min) Soj-LPC	Soj-PC	Soj-LPE	Soj-PE
Phosphatpuffer	334	61	164	43
Phosphat/NaCl-Puffer	244	30	133	23
NaCl/EDTA-Puffer	141	21	76	7
Tris/HCl-Puffer	359	56	178	38

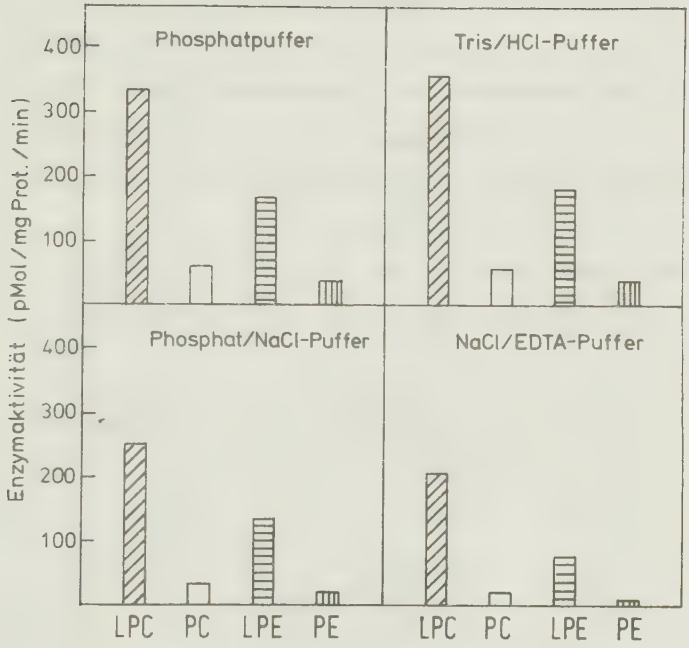

Abb. 25 Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von LP_1 gegenüber vier verschiedenen Substraten unter Verwendung von verschiedenen Puffern des gleichen pH-Wertes.

Ergebnis:

Aus Tab. 11 und Abb. 25 ist deutlich zu ersehen, daß sich von den vier getesteten Puffern nur Phosphatpuffer und Tris/HCl-Puffer als günstig für die Aktivität des Enzympräparates LP_1 erwiesen. Die Aktivität unter Verwendung von Phosphat/NaCl-Puffer war nicht optimal, während sie unter Verwendung von NaCl/EDTA-Puffer deutlich gehemmt wurde. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Enzymaktivität in starkem Maße von der Zusammensetzung des Puffermediums abhängig ist.

3.7.4. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Enzymaktivität

Die meisten Enzyme erreichen bei einem charakteristischen pH-Wert ihre maximale Aktivität. Zum Nachweis der pH-Abhängigkeit der Enzym-Aktivität wurde zunächst Puffer im pH-Bereich zwischen pH 4,0 und pH 9,0 hergestellt. Der Einfluß des pH-Wertes wurde nicht nur in Bezug auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates ausgetestet, sondern auch in Bezug auf die Phospholipase-Aktivität.
Folgende Puffer wurden zu diesem Zweck hergestellt:

1- pH=4,0 : 1,356 Glycin + 1,055 g NaCl + 19,4 ml 0,1N-HCl ad 1L
(0,2 M Glycin-HCl-puffer)

2- pH=5,0 : 2,700 g KH_2PO_4 + 0,0285 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ad 1L (0,02 M;Phosph.-puf.)

3- pH=6,0 : 2,420 g " + 0,3950 g " ad 1L (")

4- pH=7,0 : 1,124 g " + 2,0950 g " ad 1L (")

5- pH=7,4 : 0,536 g " + 2,8600 g " ad 1L (")

6- pH=8,0 : 0,101 g " + 3,4300 g " ad 1L (")

7- pH=9,0 : 0,606 g Tris + 5,3 ml 0,1N-HCl ad 1L (0,02 M; Tris/HCl-puf.)

Diese Puffer wurden zum einen als Lösungsmittel für gleiche Mengen des jeweiligen Substrates verwendet und zum anderen als Dialysemedium für gleiche Mengen des Enzympräparates LP_1.
Zunächst wurden Kontrollansätze hergestellt, welche nur Substrat im Puffer enthielten. Je Ansatz wurde 1 µMol des jeweiligen Substrates verwendet. Die Enzym- und Kontrollansätze wurden für 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend wurden die freigesetzten Fettsäuren gaschromatographisch bestimmt. Der Einfluß des pH-Wertes auf die Enzymaktivität ist in Abb. 26 dargestellt.

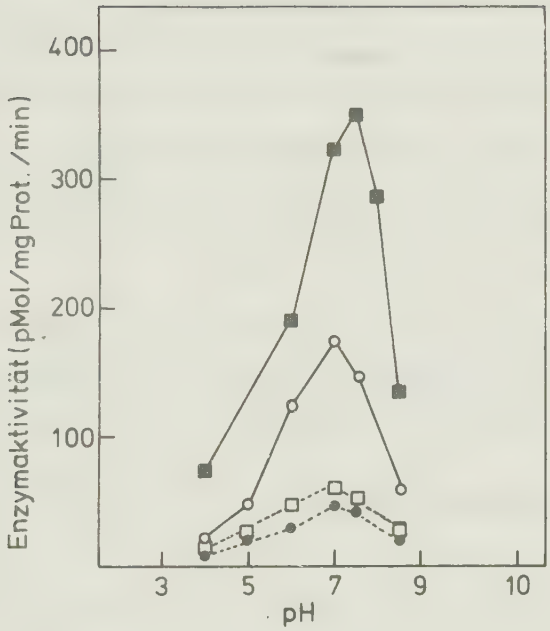

Abb. 26 Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Enzymaktivität. Die Aktivität wurde getestet gegenüber (□——□) LPC, (□----□)PC, (○——○)LPE, (●----●)PE.

Ergebnis:

Das pH-Optimum des Enzympräparates LP_1 liegt im physiologischen pH-Bereich. Das Enzympräparat zeigt bei allen getesteten Substraten die höchste enzymatische Aktivität bei einem pH-Wert von 7,5.

3.7.5. Bestimmung der Michaelis-Konstanten

Die Kenntnis der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Konzentration des Substrates ist von großer praktischer Bedeutung für die Wahl optimaler Substratkonzentrationen als Standardbedingungen für die Messung der Enzymkonzentration. Die Geschwindigkeit der Enzymreaktion ist von der Substratkonzentration abhängig. Mit steigender Substratkonzentration wird schließlich die maximale Geschwindigkeit erreicht.
Zur Ermittlung der optimalen Substratkonzentration wurde deswegen das Verfahren von Lineweaver und Burk (111) angewandt. Nach dieser Methode lassen sich sowohl K_m als auch V_{max} bestimmen.
V_{max} ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, während K_m die Michaelis-Konstante ist. Die Michaelis-Konstante (K_m) gibt diejenige Substratkonzentration an, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halb so groß ist wie die maximale.
Für die Reaktionsgeschwindigkeit ist:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m} = \frac{V_{max}}{1 + K_m / [S]}, \qquad (1)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}, \qquad (2)$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit,

V_{max} = maximale Geschwindigkeit,

$[S]$ = Substratkonzentration.

Die Michaelis-Konstante ist keineswegs eine absolute Konstante, sondern hängt von pH, Temperatur, Kofaktoren, Puffer ... etc. ab.
In dieser Arbeit wurde die Enzymreaktion in Phosphatpuffer (0,02 M; pH=7,4) bei einer Temperatur von 37°C und ohne Kofaktoren durchgeführt. Als Substrate wurden Lysophosphatidylcholin (LPC), Lysophosphatidyläthanolamin (LPE), Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidyläthanolamin (PE) aus Sojabohnen in einer Verdünnungsreihe verwendet. Bildet man die Reziprokwerte von Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit, so erhält man gemäß Gleichung 2 für einen Teilbereich der Konzentrationen eine Gerade (Lineweaver-Burk-Diagramm).

Ergebnis:

Aus den Abbildungen 27, 28, 29 und 30 sind die K_m-Werte graphisch aus den Daten über den Einfluß der verschiedenen Substratkonzentrationen auf die Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt worden.
Der K_m-Wert beträgt für Lysophosphatidylcholin 0,26 mM und für Lysophosphatidyläthanolamin 0,42 mM. Bei den verwendeten Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin wurde die Enzymaktivität durch zu große Substratmengen bereits gehemmt, bevor eine Sättigung damit eingetreten ist. Hierbei handelt es sich um eine scheinbare Michaelis-Menten Reaktion.
Der K_m-Wert für Phosphatidylcholin unter den oben genannten Reaktionsbedingungen beträgt 1,11 mM und für Phosphatidyläthanolamin 1,32 mM.

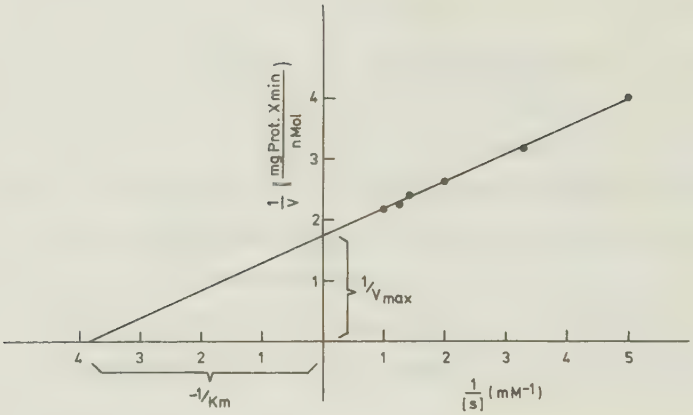

Abb. 27 Lineweaver-Burk-Diagramm für die Deacylierung von Lysophosphatidylcholin. Der K_m-Wert für LPC beträgt 0,26 mM.

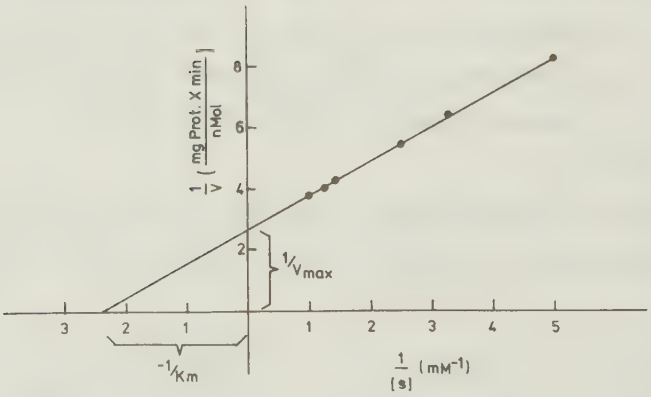

Abb. 28 Lineweaver-Burk-Diagramm für die Deacylierung von Lysophosphatidyläthanolamin. Der K_m-Wert für LPE beträgt 0,42 mM.

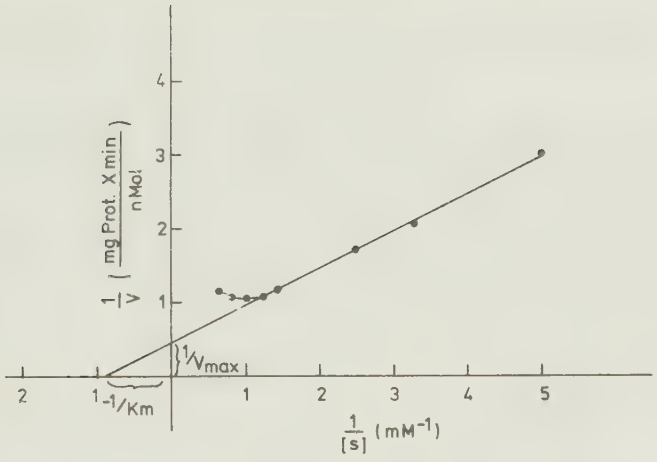

Abb. 29 Lineweaver-Burk-Diagramm für die Deacylierung von Phosphatidylcholin. Der K_m-Wert für PC beträgt 1,11 mM.

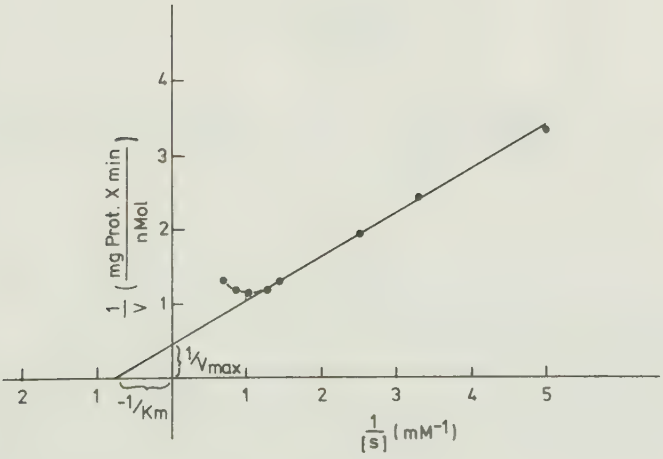

Abb. 30 Lineweaver-Burk-Diagramm für die Deacylierung von Phosphatidyläthanolamin. Der K_m-Wert für PE beträgt 1,32 mM.

3.7.6. Stabilität des Enzympräparates LP_1

Hierfür wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen von Enzymlösung LP_1 für 6 Wochen bei 4°C im Kältelabor aufbewahrt. Eine Untersuchung der Enzymaktivität erfolgte wöchentlich.
Ebenso wurde der Einfluß von wiederholtem Einfrieren und Auftauen auf die enzymatische Aktivität geprüft.

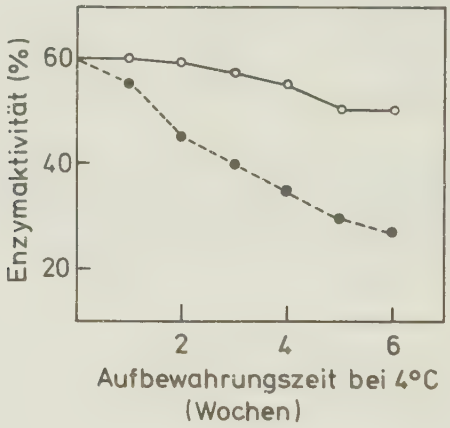

Abb. 31 Stabilität der Lysophospholipase LP_1 in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit im Kältelabor bei 4°C.
(o——o) Enzymkonzentration (0,1 mg/ml)
(●----●) Enzymkonzentration (1 mg/ml)

Ergebnis:

Die Enzymlösung LP_1 in einer Konzentration von 0,1 mg Prot./ml zeigte eine große Stabilität, während das Enzympräparat in der Konzentration von 1 mg Prot./ml etwa 50% seiner Aktivität nach 4 Wochen verlor (Abb. 31). Durch zehnmaliges Einfrieren und Auftauen nahm die Aktivität des Enzyms nur um 20% ab.

3.7.7. Inaktivierung durch Harnstoff

Das Enzympräparat LP_1 wurde zu gleichen Mengen und jeweils in zwei Gruppen in 2 M, 4 M, 6 M und 8 M Harnstofflösung für 24 Stunden dialysiert. Anschließend wurde jeweils eine dieser Gruppen gegen physiologische NaCl/Phosphat-Lösung (pH=7,4) rückdialysiert. Aus den gegen die verschiedenen Harnstoffkonzentrationen dialysierten Proben wurden, ebenso wie aus den rückdialysierten Proben, Inkubations- und Kontrollansätze durch Zusatz von Soj-LPC hergestellt. Der Einfluß von Harnstoff auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1 ist in Abb. 32 dargestellt.

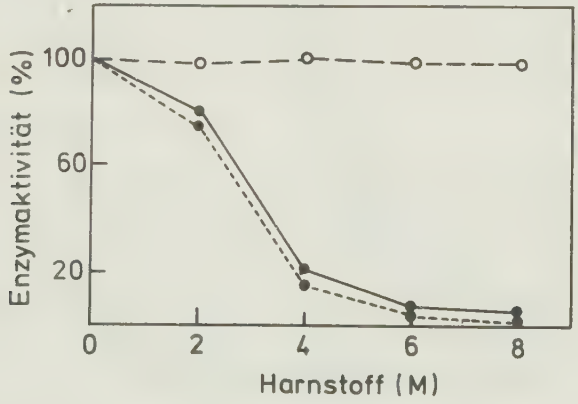

Abb. 32 Der Einfluß von Harnstoff auf die Lysophospholipase, Aktivität von LP_1 (●——●), Kontrollwerte ohne Harnstoff (o---o), Aktivität nach der Rückdialyse (●---●).

Ergebnis:

In diesem Versuch bewirkt der Harnstoff eine irreversible Hemmung der Lysophospholipase-Aktivität von LP_1, die bereits bei 6 M Harnstoff vollständig ist.

3.7.8. Hitzeinaktivierung

Die Wärmeempfindlichkeit des Enzympräparates LP_1 wurde untersucht, indem das Enzympräparat 30 Minuten bei verschiedenen Temperaturen vorinkubiert wurde. Nach der Hitzeexposition wurde die Aktivität gegen Soj-LPC, -LPE, -PC und -PE untersucht.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 33 dargestellt. Die Hemmung der Enzymaktivität im Vergleich zum nicht hitzeexponierten Ansatz ist hierbei in % ausgedrückt.

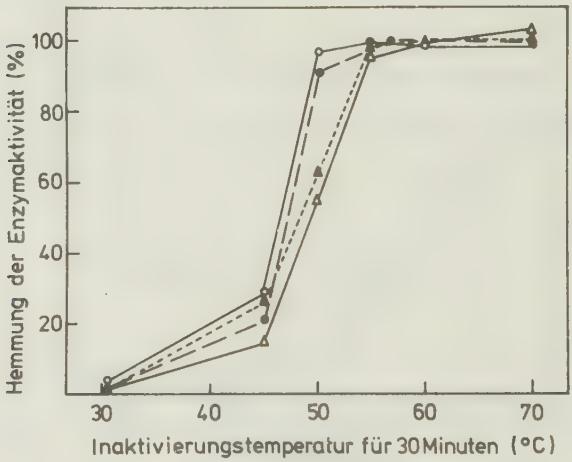

Abb. 33 Hitzeinaktivierung der enzymatischen Aktivität von LP_1. Getestet wurde die Aktivität gegenüber (o——o)LPC, (▲----▲)PC, (●----●)LPE und (▲——▲)PE.

Ergebnis:

Der Versuch zeigt, daß das auszutestende Enzympräparat LP_1 hitzeempfindlich ist. Das Enzympräparat verliert seine Aktivität nach einer 30-minütigen Inkubation bei 55°C. Das gilt für alle vier getesteten Substrate.

3.7.9. Einfluß einiger Aktivatoren und Inhibitoren auf die enzymatische Aktivität des Enzympräparates LP_1

Die Untersuchung von Enzym-Hemmstoffen kann Informationen liefern über die Art der funktionellen Gruppen des aktiven Zentrums, wie auch über den Mechanismus der Enzymwirkung und die Beteiligung bestimmter funktioneller Gruppen an der Aufrechterhaltung der spezifischen Konformation des Enzymmoleküls. Andererseits muß zur Festlegung optimaler Reaktionsbedingungen, der Einfluß von bestimmten Kofaktoren, Metall-Ionen usw. auf die Enzymaktivität untersucht werden.

In den folgenden Versuchsreihen galten folgende Reaktionsbedingungen:

Das Reaktionsvolumen mit 3 ml, der Puffer, wenn nichts anderes erwähnt, als Phosphatpuffer mit 0,02 M und pH 7,4, die Substratkonzentration mit 1 µMol/Ansatz, wobei das Substrat immer in den gleichen Puffer wie das Enzympräparat gelöst wurde.

Die Metall-Ionen wurden zunächst 15 Minuten lang mit dem Enzympräparat inkubiert, bevor das Substrat eingesetzt wurde und anschließend für weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Enzymaktivität wurde nach gaschromatographischer Bestimmung der durch das Enzym freigesetzten Fettsäuren als pMol/mg Prot./min berechnet.

3.7.9.1. Einfluß von Ca^{2+}

Die Wirkung der Ca^{2+}-Ionen auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1 wurde mittels Austestung der enzymatischen Aktivität mit steigenden Mengen an Ca^{2+}-Ionen studiert.

Zu den Ansätzen wurden steigende Konzentrationen von jeweils 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM und 50 mM von Ca^{2+} gegeben.

Das Enzympräparat wurde zunächst gegen Tris/HCl-puffer (0,02 M; pH=7,4) dialysiert. Ebenso wurde das Substrat im gleichen Puffer gelöst. Kontrollansätze ohne Ca^{2+}-Zusatz wurden hergestellt und gleichzeitig mit den Testansätzen inkubiert. Die verschiedenen Konzentrationen con Ca^{2+}-Ionen wurden jeweils in 100 µl-Mengen zugegeben. Der Einfluß der Ca^{2+}-Ionen ist in Abb. 34 dargestellt.

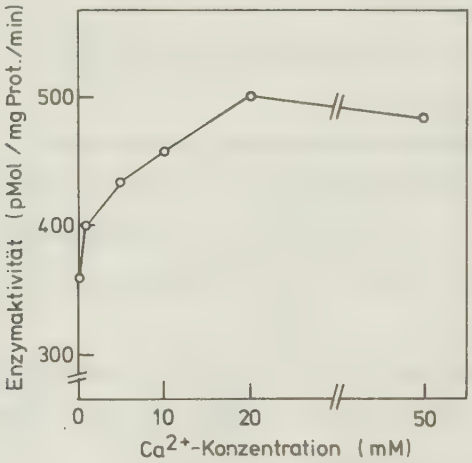

Abb. 34 Einfluß von Ca^{2+}-Ionen auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1.

Ergebnis:

Steigende Konzentrationen von Ca^{2+} stimulieren die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1. Maximale Aktivität wird bereits bei einer Konzentration von 20 mM Ca^{2+} erreicht.

Dieses Ergebnis zeigt, daß das Enzympräparat LP_1 zur Entfaltung seiner optimalen Aktivität Ca^{2+} benötigt.

3.7.9.2. Einfluß von Mg^{2+}

Dem Reaktionsmedium wurden steigende Konzentrationen von Mg^{2+} in Mengen von 100 µl zugefügt. Die einzelnen Ansätze enthielten jeweils 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM und 50 mM Mg^{2+}. Das Enzympräparat wurde gegen Tris/HCl-puffer dialysiert. Die Wirkung der Mg^{2+}-Ionen auf die Lysophospholipase-Aktivität ist in Abb. 35 dargestellt.

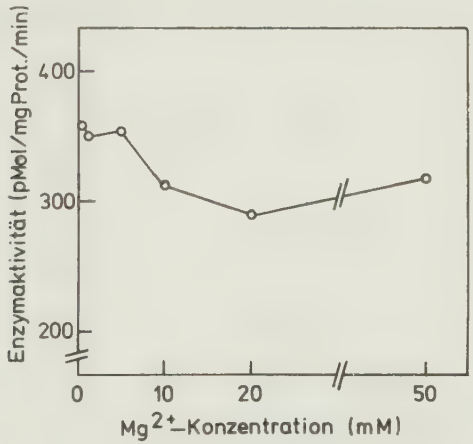

Abb. 35 Einfluß von Mg^{2+}-Ionen auf die Lysophospholipase. Aktivität des Enzympräparates LP_1.

Ergebnis:

Im Gegensatz zu Ca^{2+} vermindert Mg^{2+} etwas die Enzymaktivität. Bei einer Mg^{2+}-Konzentration von 20 mM wird eine Hemmung von etwa 20% registriert.

3.7.9.3. Einfluß von EDTA

Die Wirkung von EDTA auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1 wurde geprüft, indem EDTA in ansteigenden Konzentrationen von jeweils 100 µl-Mengen/Ansatz dem Inkubationsmedium zugegeben wurde. Die einzelnen Ansätze enthielten 1 mM, 5 mM, 20 mM und 50 mM EDTA. Kontrollansätze ohne EDTA wurden hergestellt und mit den Testansätzen inkubiert.

Die Wirkung von EDTA auf die Enzymaktivität ist in Abb. 36 gezeigt.

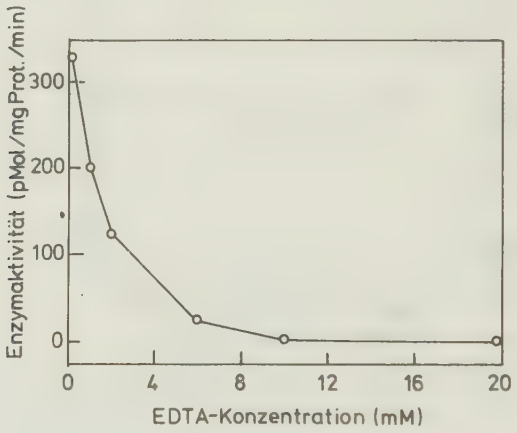

Abb. 36 Einfluß von EDTA auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1.

Ergebnis:

Aus Abb. 36 ist zu ersehen, daß EDTA schon in geringen Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf die Lysophospholipase-Aktivität hat. Bereits die Zugabe von 5 mM EDTA hemmt die Aktivität vollständig. Es könnte sein, daß diese Hemmung auf einer Blockade von Ca^{2+}-Ionen beruht.

3.7.9.4. Einfluß von Hg^{2+}- und Cu^{2+}-Ionen

Die Wirkung steigender Konzentrationen von Hg^{2+} bzw. Cu^{2+} auf die Enzymaktivität ist graphisch in Abb. 37 dargestellt.
Die einzelnen Ansätze enthielten jeweils 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM Hg^{2+}- bzw. Cu^{2+}-Ionen. Kontrollansätze ohne Hg^{2+}- bzw. Cu^{2+}-Zusatz wurden ebenso wie die Testansätze behandelt.

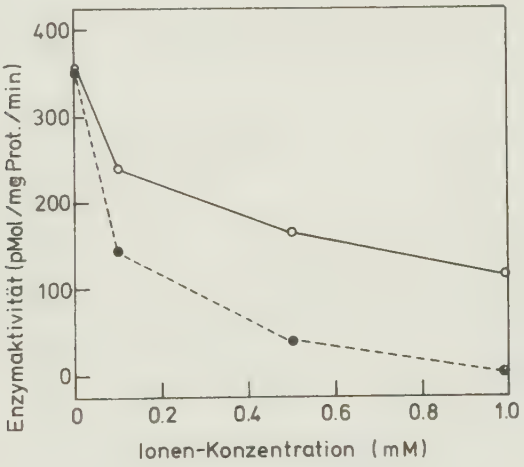

Abb. 37 Einfluß von Hg^{2+}-Ionen (●---●) und Cu^{2+}-Ionen(o——o) auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1.

Ergebnis:

Die Zugabe von 1 mM Hg^{2+} hemmt die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1 vollständig, während die Zugabe von 1 mM Cu^{2+} nur eine 70%-ige Hemmung bewirkt.

3.7.9.5. Einfluß von NaCl

In diesem Versuch wurde die Wirkung der Ionen-Stärke des Puffers durch Zugabe von steigenden Mengen von NaCl auf die Enzymaktivität untersucht.

Hierzu wurde zunächst das Enzympräparat LP_1 gegen Phosphatpuffer (0,02 M; pH=7,4) dialysiert. Die einzelnen Ansätze enthielten 0,1 M, 0,5 M und 1 M NaCl.

Der Einfluß von NaCl ist in Abb. 38 dargestellt.

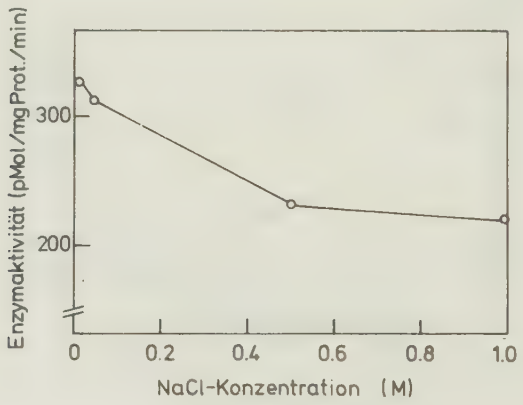

Abb. 38 Einfluß von NaCl auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1.

Ergebnis :

Durch Erhöhung der Ionen-Stärke des Inkubationsmediums nach Zugabe von 1 M NaCl in 0,02 M Phosphatpuffer wird die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1 um etwa 30% herabgesetzt. Höhere Ionen-Stärke bewirken wahrscheinlich eine Veränderung der Substrat-Enzym-Wechselwirkung.

3.7.9.6. Einfluß von NaF

Die Wirkung von Natriumfluorid (NaF) in Konzentrationen von 10 mM, 50 mM und 100 mM auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzyms LP_1 ist in Abb. 39 wiedergegeben. Das Enzympräparat LP_1 wurde gegen Phosphatpuffer dialysiert.

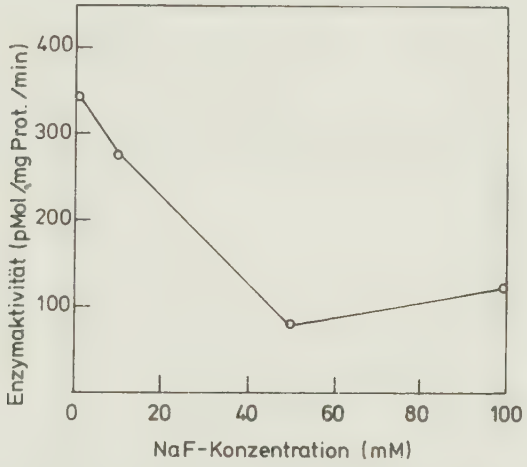

Abb. 39 Einfluß von NaF auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1.

Ergebnis:

Die Zugabe von 50 mM NaF hemmt die Lysophospholipase-Aktivität von LP_1 zwischen 60 und 75%.

3.7.9.7. Einfluß von NaN_3

Der Einfluß von Natriumazid (NaN_3) auf die Enzymaktivität wurde durch Zugabe von steigenden Konzentrationen von NaN_3 ermittelt.
Das Enzympräparat wurde gegen Phosphatpuffer dialysiert. Die einzelnen Ansätze enthielten 10 mM, 50 mM und 100 mM NaN_3 in jeweils 100 µl-Mengen.
Die Wirkung von NaN_3 auf die Lysophospholipase-Aktivität ist in Abb. 40 dargestellt.

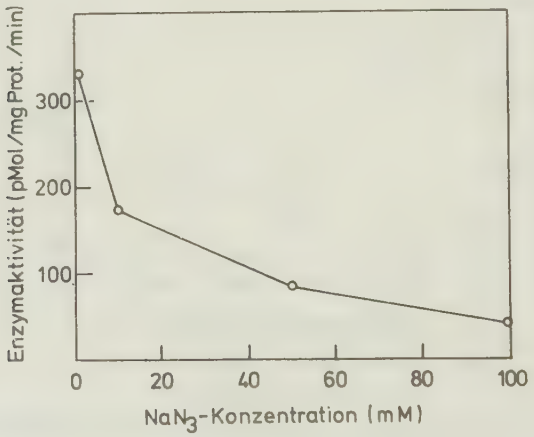

Abb. 40 Einfluß von NaN_3 auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1.

Ergebnis:

Die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1 wird durch Zugabe von NaN_3 zum Inkubationsmedium sehr stark gehemmt. Der Zusatz von 50 mM NaN_3 reduziert die Aktivität um 90%.

3.7.9.8. Einfluß einiger organischer Lösungen

Hierzu wurde die Wirkung von Methanol, Äthanol, Butanol und Äther auf die Lysophospholipase-Aktivität geprüft. Die organischen Lösungsmittel wurden in 0,5%-, 1%- und 5%-igen Konzentrationen zugesetzt. Kontrollen ohne organische Lösungsmittel wurden gleichzeitig mit den Testansätzen inkubiert.

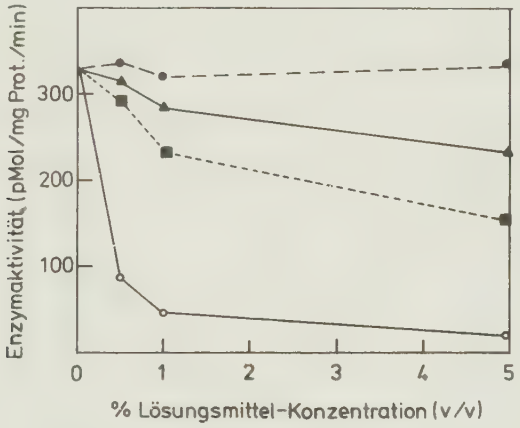

Abb. 41 Einfluß von Äther (●---●), Methanol (▲—▲), Äthanol (■---■) und Butanol (○—○) auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1.

Ergebnis:

Die vier verwendeten organischen Lösungsmittel beeinflussen die Lysophospholipase-Aktivität der Enzympräparation LP_1 unterschiedlich stark. In 5%-ige Konzentration bewirkt Äther keinerlei Aktivitätsverminderung, während der Zusatz von primären Alkoholen in gleichen Mengen zunehmende Hemmung mit steigender Kohlenwasserstofflänge des aliphatischen Restes verursacht. Bereits 5% Butanol führen zu einer Aktivitätsverminderung von 90%, wohingegen Methanol nur zu 20% und Äthanol zu 55% hemmen.

3.7.9.9. Einfluß der Detergentien DOC und SDS

In diesem Versuch wurde die Wirkung von Natriumdesoxycholat (DOC) und Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS) auf die Lysophospholipase-Aktivität getestet. Zu den Ansätzen wurden DOC bzw. SDS in Mengen von jeweils 0,1, 0,25, 0,5 und 1 mg/Ansatz zugegeben.

Das Ergebnis ist in Abb. 42 dargestellt.

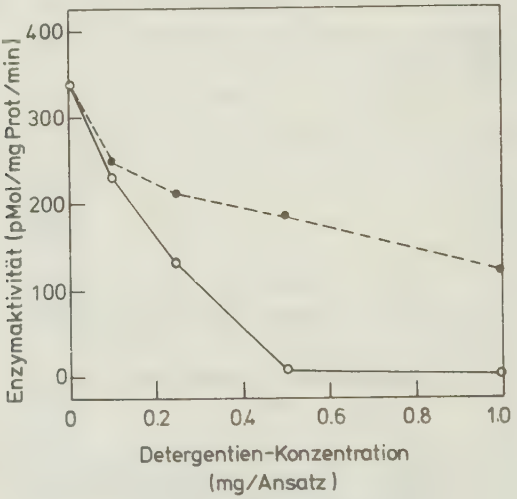

Abb. 42 Einfluß von DOC (o——o) und SDS (●---●) auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1.

Ergebnis:

Die Zugabe von 1 mg SDS/Ansatz bewirkt eine 65%-ige Hemmung, während die gleiche Menge an DOC zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führt. Die Wirkung dieser Detergentien ist vermutlich auf eine Änderung der Substrateigenschaften, das heißt, eine Änderung in der Größe, der Zusammensetzung und der Oberflächenladung der Substratmizellen zurückzuführen.

3.7.9.10. Nachweis essentieller freier SH-Gruppen

Es wurde versucht das Vorhandensein essentieller freier SH-Gruppen in der Enzymfraktion LP_1 nachzuweisen durch Enzyminhibition mit dem SH-Blocker p-Chlormercuribenzoat (PCMB) und Reaktivierung mit 2-Mercaptoäthanol. Es wurden Ansätze mit steigenden Mengen an PCMB (0.125 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM und 2 mM) hergestellt und bei 37°C für 3 Stunden lang inkubiert. Die Wirkung von 2-Mercaptoäthanol als reaktivierende Substanz wurde geprüft, indem ein Teil der Testansätze 15 Minuten lang mit den verschiedenen Konzentrationen von PCMB inkubiert und gleich danach jeweils 10 mM 2-Mercaptoäthanol hinzugefügt. Das Gemisch wird weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

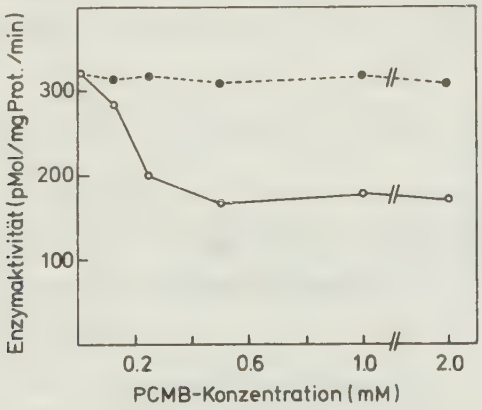

Abb. 43 Wirkung von p-Chlormercuribenzoat (PCMB) (o—o) und 2-Mercaptoäthanol (●---●) auf die Lysophospholipase-Aktivität von LP_1.

Ergebnis:

Eine maximale Hemmung von 50% wurde bereits bei 0.5 mM PCMB erreicht. Höhere Hemmstoffkonzentrationen bewirken keine weitere Aktivitätsverminderung. Durch Zugabe von 10 mM 2-Mercaptoäthanol wird diese Hemmung völlig beseitigt.

3.7.9.11. Wirkung von Diisopropylflurophosphat (DFP)

Die Serin-blockierende Substanz (DFP) wurde in steigenden Konzentrationen dem Inkubationsmedium zugegeben. Die einzelnen Ansätze enthielten jeweils 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM von DFP.
Das Ergebnis ist in Abb. 44 gezeigt.

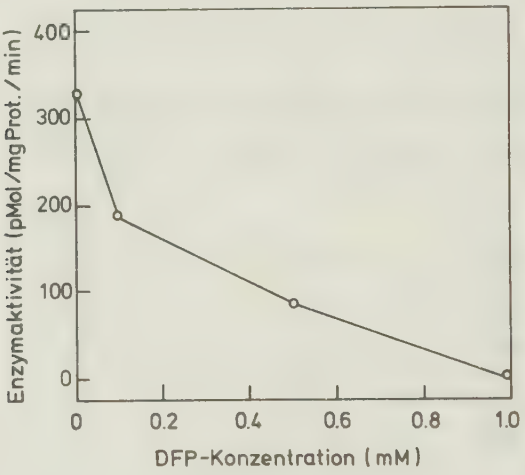

Abb. 44 Einfluß von Diisopropylflurophosphat (DFP) auf die Lysophospholipase-Aktivität des Enzympräparates LP_1.

Ergebnis:

Die Zugabe von 1 mM DFP führt zu vollständigem Aktivitätsverlust. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß Serin am aktiven Zentrum beteiligt ist.

3.7.9.12. Wirkung von Albumin auf die Enzymaktivität

Hierbei wurde die Änderung der enzymatischen Aktivität des Enzympräparates LP_1 durch Zugabe von Albumin zum Inkubationsmedium untersucht. Humanserumalbumin in Konzentrationen von 0,1, 0,2 und 0,5 µ Mol/Ansatz wurde mit der Substratlösung 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzympräparat zugegeben und das Gemisch 3 Stunden lang bei 37°C inkubiert.

Ergebnis:

Die Zugabe von Albumin bis zu einer Konzentration von 0,5 µ Mol/Ansatz erbrachte keine wesentliche Verbesserung der Aktivität.

3.7.9.13. Die Wirkung von Palmitinsäure- und Ölsäure-Zusatz

Um die Wirkung der End-Produkte auf die Enzymreaktion zu untersuchen, wurden Palmitinsäure bzw. Ölsäure in Konzentrationen von 0,1 µM, 1 µM, und 2 µM zum Inkubationsmedium gegeben und anschließend die Ansätze für 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

Ergebnis:

Die Zugabe von Palmitinsäure in Konzentrationen bis 2 µM hat keinerlei Einfluß auf die Lysophospholipase-Aktivität der Enzympräparation LP_1, während die gleiche Konzentration von Ölsäure eine sehr geringe hemmende Wirkung von etwa 5% zeigte.

3.8. Vorbehandlung des Enzympräparates LP_1 mit Neuraminidase aus Clostridium Perfringens

Die Enzymfraktion LP_1 wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von Neuraminidase (0.1, 0.25, 0.5 und 1mg/0.2mg Enzymprotein) 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Substrat zugegeben und mit der behandelten Enzympräparation 3 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Kontrollansätze mit der behandelten Enzympräparation und dem Substrat wurden bei 4°C aufbewahrt. Die Wirkung von Neuraminidase auf die Lysophospholipase-Aktivität ist in Abb. 45 dargestellt.

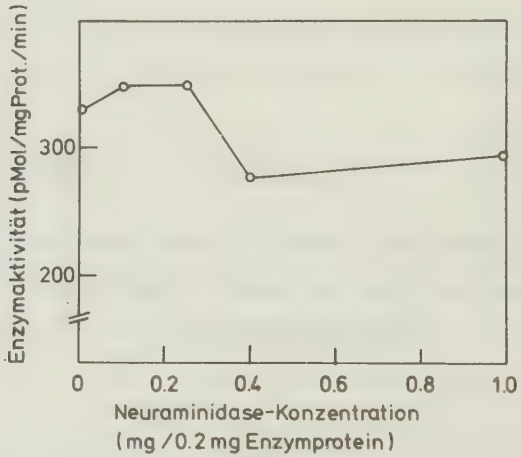

Abb. 45 Wirkung von Neuraminidase auf die Lysophospholipase-Aktivität der Enzympräparation LP_1.

Ergebnis:

Die Neuraminidase-Behandlung von dem Enzympräparat LP_1 bis zur Konzentration von 1 mg / 0.2 mg Enzymprotein bewirkt nur einen Aktivitätsverlust zwischen 5% und 10%.

3.9. Austestung der Wirkung eines Glukokortikoids auf die Enzymaktivität

Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium (Solu-Decortin^{P}-H) wurde zu diesem Zweck in verschiedenen Konzentrationen zunächst mit dem Enzympräparat LP_1 10 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Substrat zugegeben und der Ansatz 1 Stunden lang bei 37°C weiter inkubiert. Die einzelnen Ansätze enthielten 0.01, 0.1, 1.0 oder 2.0 mg Solu-Decortin / mg Enzymprotein. Die verschiedenen Konzentrationen von Solu-Decortin wurden in jeweils 100 µl-Mengen dest. Wasser gelöst.

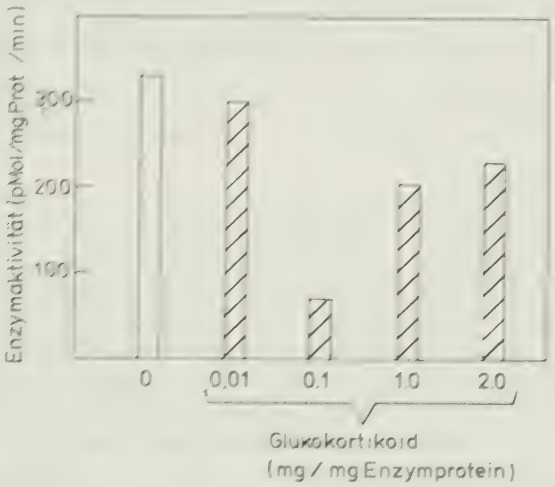

Abb. 46 Wirkung des Glukokortikoid (Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium) auf die Lysophospholipase-Aktivität der Enzympräparation LP_1.

Ergebnis:

Ein maximaler Aktivitätsverlust wurde bei einer Konzentration des Glukokortikoid von 0.1 mg / mg Enzymprotein registriert. Bei höheren oder niedrigeren Konzentrationen wird die Aktivität weniger stark beeinträchtigt.

3.10. Einfluß des Enzympräparates LP_1 auf Erythrozytenmembranphospholipide

Phospholipasen verschiedenen Ursprungs reagieren völlig unterschiedlich auf Membranphospholipide. Manche Phospholipasen greifen Membranphospholipide von intakten Erythrozyten an, was zu einer Hämolyse führt. Andere Phospholipasen können Phospholipide der intakten Erythrozytenmembran nicht abbauen, greifen jedoch Erythrozyten-Schatten an.

In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung der hochgereinigten Enzymfraktion LP_1 auf intakte Erythrozyten- und Schatten-Membranen untersucht.

Humanerythrozyten wurden aus frischen Konserven bzw. aus bei 4°C gelagerten ACD-Konserven entnommen, 3 mal in der Zentrifuge mit physiologischer Kochsalz-Lösung mit 0,001 M EDTA (pH=7,4) gewaschen und als gewaschenes Sediment eingesetzt.

Die Erythrozyten-Schatten wurden in Anlehnung an Dodge et al (112) hergestellt. Zunächst wurden gewaschene Erythrozyten mit 30-fachem Volumen von 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH=7,4) bei 4°C hämolysiert. Danach mehrmaliges Waschen mit demselben Puffer, bis eine gelblich-weiße Farbe der Schatten erreicht wurde. Anschließend wurden die Schatten mit Tris/HCl-Puffer suspendiert und wieder auf das Ausgangsvolumen gebracht.

Gepackte Erythrozyten (0,1, 0,2 und 0,5 ml) wurden mit isotonischer Kochsalz-Phosphat-Lösung auf 5 ml verdünnt. Das Enzympräparat LP_1 wurde in Mengen von 0,2 mg den verdünnten Erythrozyten-Proben zugegeben und beigemischt. Das Gemisch wurde für 1 Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Gemisch zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und in zwei Teile geteilt. In einem Teil wurde der Grad der Hämolyse bestimmt, in anderen die Konzentration der freien Fettsäuren.

Zur Bestimmung des Hämolyse-Grades wurden 0.2 ml des Überstandes mit 5 ml dest. Wasser verdünnt und die Extinktion bei 418 nm gemessen. Als Leerwert wurde Wasser verwendet. Um eine 100%-ige Hämolyse zu erreichen, wurde bei einer Inkubation anstelle der isotonischen Pufferlösung dest. Wasser verwendet.
Die enzymatische Wirkung auf die Membranphospholipide wurde durch Bestimmung der nach der Inkubation freigesetzten Fettsäuren untersucht.

Die Erythrozyten-Schatten wurden ebenso wie die intakten Zellen behandelt und mit dem Enzympräparat inkubiert. Danach wurden die freien Fettsäuren extrahiert, verestert und anschließend gaschromatographisch bestimmt.

Ergebnis:

Das Enzympräparat LP_1 greift weder intakte Erythrozyten noch Erythrozyten-Schatten wesentlich an.
Bei intakten Erythrozyten wurde eine geringfügige Hämolyse von maximal 2% gemessen. Eine Freisetzung von Fettsäuren wurde nicht festgestellt.
Bei Erythrozyten-Schatten wurde ebenfalls kein signifikanter Abbau (< 5%) der Membranphospholipide festgestellt.

3.11. Untersuchungen einiger Eigenschaften der Enzympräparation LP_2

Die zweite, aus Humanserum gewonnene Fraktion LP_2, wurde in der vorliegenden Arbeit nur 200-fach angereichert.
Trotz der Unreinheit dieses Präparates wurde untersucht, ob diese Fraktion und die erste Fraktion LP_1 ähnliche Eigenschaften besitzen oder ob es sich um zwei verschiedene Enzyme handelt.
Dazu wurden einige Versuche durchgeführt, um eine teilweise Charakterisierung des Enzympräparates LP_2 darzustellen.
Da die Durchführung dieser Versuche bereits für das Enzympräparat LP_1 ausführlich beschrieben wurden, wird hier nur eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse dargestellt.

3.11.1. Substratspezifität

Tab. 12 Die getestete Aktivität von LP_2 beim enzymatischen Abbau unterschiedlicher Substrate.

Substrat	Getestete Aktivität von LP_2 +) (pMol/mg Prot./min)
Soj - Lysophosphatidylcholin	25,70
Soj - Phosphatidylcholin	10,45
Soj - Lsyophosphatidyläthanolamin	22,50
Soj - Phosphatidyläthanolamin	12,69

+)
Die enzymatische Aktivität wurde nach 3 stündiger Inkubation bei 37°C gemessen. Der verwendete Puffer war 0,02 M Phosphatpuffer (pH=7,5).

Aus Tab. 12 ist zu ersehen, daß die Lysophosphatide Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidyläthanolamin durch die in der Fraktion LP_2 enthaltene Lysophospholipase in etwa gleichem Maße abgebaut werden. Die Phosphatide Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin werden durch die in der LP_2-Fraktion enthaltene Phospholipase in annähernd gleichem Maße abgebaut. Es ist daher anzunehmen, daß das Wirkspektrum dieser Enzympräparation neben der überwiegenden Lysophospholipase-Aktivität eine primär nicht erkennbare Phospholipase-Aktivität umfaßt.

3.11.2. Einfluß des pH-Werts auf die LP_2-Aktivität

Das Enzympräparat LP_2 zeigt seine höchste Aktivität im pH-Bereich von pH 7,5-8,0.

3.11.3. Stabilität des Enzympräparates LP_2

Das Enzympräparat LP_2 zeigt eine sehr viel höhere Stabilität bei Aufbewahrung bei 4^oC. Diese Enzympräparation kann in einer Konzentration von 1 mg Protein/ml mindestens 4 Wochen lang bei 4^oC ohne wesentlichen Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.
Andererseits verliert das Enzympräparat seine Aktivität vollständig nach einer 30-minütigen Inkubation bei einer Temperatur zwischen 55 und 60^oC.

3.11.4. Die Wirkung einiger Metall-Ionen und Enzym-Inhibitoren auf LP_2

Hierbei wurde als Substrat Soj-Lysophosphatidylcholin verwendet. Die verwendeten Metall-Ionen sowie die Hemmstoffe wurden zuerst 15 Minuten lang lediglich mit dem Enzympräparat bei 37^oC inkubiert.
In allen Versuchen wurde Tris/HCl-Puffer (0,02 M; pH=7,5) verwendet.
Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tab. 13 wiedergegeben.

Tab. 13 Wirkung von einigen Metall-Ionen und Enzym-Inhibitoren auf die Aktivität des Enzympräparates LP_2

Zugesetzte Substanzen	Konzentration der zuges. Substanzen	Aktivität (%)
Ohne	-	100
Ca^{2+}	10 mM	98
	20 mM	97
Mg^{2+}	10 mM	100
	20 mM	100
EDTA	1 mM	74
	5 mM	34
Hg^{2+}	1 mM	0
NaCl	0,5 M	96
	1 M	84
DFP	0,5 mM	56
	1 mM	4
PCMB	0,2 mM	100
	1 mM	100
DOC	(1 mg/Ansatz)	44
Äther	1% (v/v)	95
	5% (v/v)	70

4. Besprechung

Phosphoglyceride aus Membranen von Säugetierzellen werden hauptsächlich durch Deacylierung mittels Phospholipase A (EC 3.1.1.4) und Lysophospholipase (EC 3.1.1.5) abgebaut. Der Abbau des an die Lipoproteine gebundenen Phosphatidylcholin (PC) erfolgt fast ausschließlich durch das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) (113). Dieses Enzym bewirkt den Transfer einer Fettsäure von Phosphatidylcholin auf Cholesterin, wobei Cholesterinester und Lysophosphatidylcholin (LPC) entstehen.

Das durch die LCAT-Reaktion entstehende Lysophosphatidylcholin ist, wegen seiner membrantoxischen Eigenschaften, ein bekannter physiologisch hochaktiver Stoff.

Die verschiedenen biologischen Wirkungen, die von Lysophosphatidylcholin beschrieben worden sind, scheinen auf der Wirkung des Lysophosphatidylcholins auf die Zellmembran zu beruhen.

Als Reaktionspartner an der Membran werden das Cholesterin (114), Phosphatidylcholin (115, 116, 117) und die Nichtlipidanteile der Membran (118) diskutiert. So findet man bei LPC-Konzentrationen, die noch nicht zu Hämolyse führen, eine Beeinflussung der Natrium-Kalium-Pumpe der Membran mit Verminderung des aktiven Transportes von Kalium- und Natrium-Ionen (119).

In Spermien bewirkt LPC eine Abnahme der Beweglichkeit (120), möglicherweise durch Veränderung des Membranpotentials und der Membranstabilität verursacht.

Die elektrophoretische Beweglichkeit von Ascites-Tumor-Zellen verringert sich mit ansteigender Zufuhr von Lysophosphatidylcholin (121).

Lysophosphatidylcholin führt zu einer Hemmung der beschleunigten Blutkörperchensenkung (59). Diesem Effekt liegt die beobachtete Sphärozytose zugrunde (122, 123), die eine Agglomeration (124) verhindert. Lysophosphatidylcholin bewirkt anfänglich eine Veränderung der Zellmembran und löst in höheren Konzentrationen eine Zytolyse aus. Eine Zytolyse wurde bei Erythrozyten, sowie bei Mastzellen (125) mit begleitender Histaminfreisetzung (126) gefunden.
Eine Steigerung der LPC-Konzentration bewirkt eine entsprechend zunehmende Hemmung der Reaktionsfähigkeit von Thrombozyten. Nach überschreiten einer Schwellkonzentration kommt es zur Zerstörung der Thrombozyten (127). Wird LPC mit Albumin oder Plasma inkubiert, so wird die lytische Aktivität bedingt durch die Ausbildung des inaktiven Albumin-Lysophosphatidylcholin-Komplexes neutralisiert (128). Berlin und Mitarb. (129) berichten über erniedrigte Werte der Serum-LPC-Konzentrationen bei Patienten mit chronischen ischämischen und peripheren arteriellen Erkrankungen. Noch niedrigere Werte werden von Patienten berichtet, die sich im akuten Stadium des Myocardinfarktes befinden. Erniedrigte Serum-LPC-Konzentrationen wurden weiterhin bei Schwangeren nachgewiesen, sowie bei Frauen, die orale Kontrazeptiva einnehmen. Im letzten Fall fand man, daß eine gesteigerte Plättchenaggregation mit erniedrigten Serum-LPC-Konzentrationen korrelieren (129).
Intravenöse Verabreichung von Heparin (500-5000 I.E.) erhöht die Serum-LPC-Bildung beim Menschen (129). Eine irreversible Plättchenaggregation, die durch Kollagen oder Adrenalin induziert wurde, war nach Heparin-Verabreichung signifikant erniedrigt (130, 131).

Wurden Thrombozyten in vitro verschiedenen Konzentrationen von Lysophosphatidylcholin ausgesetzt, die denjenigen in vivo entsprechen, zeigten sich keine funktionellen Änderungen. Heparin stimuliert durch induzierte Post-Heparin-Phospholipase eine erhöhte Bildung von Lysophosphatidylcholin in vivo, was zur beobachteten Abnahme der irreversiblen Plättchenaggregation führt (129).

Für die Analyse der biologischen Wirkungen von Lysophosphatiden war der Nachweis von Enzymen von großer Bedeutung, die die chemische Umwandlung von Lysophosphatiden spezifisch katalysieren.

Oliveira und Lands (132,133) entdeckten eine Acyltransferase in menschlichen Erythrozyten, die Lysophosphatidylcholin zu Phosphatidylcholin oder auch Lysophosphatidyläthanolamin zu Phosphatidyläthanolamin acyliert. Van Deenen und Mitarb. (134) haben eine Lysophospholipase, die Lysophosphatidylcholin zu Glycrophosphorylcholin und Fettsäure deacyliert, beschrieben.

Obwohl Lysophospholipasen in der Natur weit verbreitet sind, wurden bisher nur wenige Versuche unternommen, diese Enzyme zu reinigen. Aus Rinderpankreas wurde das Enzym 40-fach angereichert (24), aus Rattenhirn 20-fach (49) und aus Humanserum 65-fach (65).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Lysophospholipasen in menschlichem Serum nachgewiesen. Davon wurde eine etwa 3000-fach, die andere etwa 200-fach angereichert.

In der Literatur wurden verschiedene Methoden für den Nachweis von Lysophospholipase-Aktivitäten beschrieben. Bei diesen Untersuchungen dienten 1-Acyl-Glycero-3-Phosphorylcholin und 1-Acyl-Glycero-3-Phosphoryläthanolamin häufig als Substrate.

In einer der beschriebenen Methoden werden Substrate mit radioaktiven Fettsäuren verwendet (51,54), die durch enzymatische Reaktion freigesetzt werden und anschließend mittels Radiodünnschichtchromatographie bestimmt werden. Andere Methoden beruhen auf der Wasserlöslichkeit und Bestimmung der hydrophilen Reaktiosnprodukte Glycero-3-Phosphorylcholin oder Glycero-3-Phosphoryläthanolamin.
In der von Hubmann (65) beschriebenen Methode zur Quantifizierung des enzymatischen Substratabbaues wurde die Abnahme von ^{32}P-markiertem Lysophosphatidylcholin bestimmt.
Die Verwendung von ^{32}P ermöglicht lediglich die radioaktive Markierung von Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin, sowie des als Abbauprodukt entstehenden wasserlöslichen Glycerophosphorylcholins, das durch Radiodünnschichtchromatographie nicht erfaßt werden kann.

Die beim Abbau von ^{32}P-Lysophosphatidylcholin zusätzlich freigesetzten und nicht markierten Fettsäuren können dabei nur durch ein chemisches Verfahren quantitativ bestimmt werden.

Hubmann (65) hat den enzymatischen Abbau von ^{32}P-markiertem Lysophosphatidylcholin nach 20-stündiger Inkubation mit Humanserum oder Serumfraktion bestimmt. In Versuch Nr. 3.3. dieser vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß der Substratabbau jedoch nur während einer 9-stündigen Inkubationszeit linear verläuft. Dies erklärt, daß die Berechnung der spezifischen Aktivität nach 20-stündiger Inkubation keine vergleichbaren Werte ergibt.
Die Untersuchungsmethode wurde von Scherer et al (135) wesentlich verbessert, indem er C^{14}-markierte Substrate verwendet. Durch C^{14}-markierte Substrate werden sowohl die eingesetzten Lysophospholipide und Phospholipide als auch die beim Substratabbau freigesetzten Fettsäuren radio-

aktiv markiert. Die hiermit ermöglichte radiodünnschichtchromatographische Bestimmung der Menge der freigesetzten ^{14}C-markierten Fettsäuren erlaubt eine wesentlich feinere Messung des erfolgten Substratabbaues. Andererseits wird durch die Radiodünnschichtchromatographie jedoch nur jeweils die Summe der beim Substratabbau freigesetzten ^{14}C-markierten Fettsäuren erfaßt. Somit erlaubt diese Methode nur grob-qualitative Aussagen über die Substratspezifität des Enzyms.

In dieser Arbeit wurde zur quantitativen Ermittlung der Menge der durch enzymatischen Abbau freigesetzten Fettsäuren die Gas-Flüssig- Chromatographie eingesetzt.

Obwohl bei der Radiodünnschichtchromatographie und der Gaschromatographie die Ausbeute an gesamten Fettsäuren etwa gleich groß war, besitzt die gaschromatographische Methode deutliche Vorteile. Da bei dieser Methode keine radioaktiven Substanzen benötigt werden, liegen die Materialkosten wesentlich niedriger.
Im Gegensatz zur Radiodünnschichtchromatographie, erlaubt die Gaschromatographie die differenzierte Bestimmung von einzelnen Fettsäuren. Die Fettsäurespezifität läßt sich somit eindeutig bestimmen. Die enorme Zeitersparnis bei der Vorbereitung der Fettsäuren für die Gaschromatographie erlaubt zudem, jedes Versuchsergebnis durch mehrere Wiederholungen besser abzusichern.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Anreicherungsschritte sowie die erhaltenen spezifischen Aktivitäten, Anreicherungsfaktoren und die prozentuelle Ausbeute für beide Enzympräparationen LP_1 und LP_2 sind in Tabellen 14 und 15 zusammengestellt.

Tab. 14 Anreicherungsschritte der Lysophospholipase LP_1 aus Humanserum

Anreicherungsschritt	Enzymfraktion	Proteinmenge (mg)	Aktivität U	spz. Akt. U/mg	Anreicherungs-faktor (-fach)	Ausbeute (%)
	U	28060	3592	0,128	1	100
Ammoniumsulfatfällung	N_2	10268	3009	0,293	2,29	84
DEAE-Sephadex-A-50	F_1	746	10236	13,72	107	285
Concanavalin-A-Sepharose	C_2	67	2941	43,90	343	82
Protein-A-Sepharose	P_1	9,62	2349	244,2	1908	65
Immunadsorptionschromatographie	LP_1	3,27	1257	384,4	3002	35

Tab. 15 Anreicherungsschritte der Lysophospholipase LP_2 aus Humanserum

Anreicherungsschritt	Enzymfraktion	Proteinmenge (mg)	Aktivität U	spz. Akt. U/mg	Anreicherungs-faktor (-fach)	Ausbeute (%)
	U	28060	3592	0,128	1	100
Ammoniumsulfatfällung	N_2	10268	3009	0,293	2,29	84
DEAE-Sephadex-A-50	F_6	159	1692	10,64	83	47
Concanavalin-A-Sepharose	LP_2	21,4	551	25,76	201	15,3

Der relativ geringe Anreicherungsgrad der LP_2-Fraktion (Tab. 15) geht mit einer entsprechenden Verunreinigung einher. Die enzymhaltige LP_2-Fraktion wurde zum Teil charakterisiert, um einen Vergleich mit der höher gereinigten LP_1-Fraktion zu ermöglichen und insbesondere eine Identität der beiden Fraktionen auszuschließen. Die weiteren Charakterisierungsschritte, die eine sehr reine Enzymfraktion voraussetzen, waren deshalb für die Fraktion LP_2 nicht durchführbar.

Nach Anreicherung der Enzymfraktion LP_1 wurde die hohe Reinheit des Präparates durch isoelektrische Fokussierung (Versuch Nr. 3.5.) bestätigt. Der isoelektrische Punkt von LP_1 liegt bei pH 5,5.

Das durch Gelfiltration mit Sephadex-G-200 bestimmte Molekulargewicht beträgt 135 000.
Im Vergleich zu Lysophospholipasen aus Rattenhirn (MG = 15 000 - 20 000) (49), aus Vibrio El Tor (MG = 58 000) (136), aus Rinderpankreas (MG = 65 000) (137) und aus Penicillium notatum (MG = 116 000) (138) besitzt das Enzym LP_1 das höchste Molekulargewicht.

Die Untersuchung der Substratspezifität beider Enzympräparationen LP_1 und LP_2 aus Humanserum hat gezeigt, daß neben der Lysophospholipase-Aktivität auch Phospholipase-Aktivität vorhanden ist. Beide Enzympräparate können sowohl die Lysophosphatide Lysophosphatidylcholin (LPC) und Lysophosphatidyläthanolamin (LPE), als auch die Phosphatide Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidyläthanolamin (PE) deacylieren. Bei der Fraktion LP_1 werden die einfach mit Fettsäuren veresterten Lysophosphatide LPC und LPE am stärksten abgebaut. Die Abbaurate der zweifach mit Fett-

säuren veresterten Phosphatide PC und PE beträgt etwa 1/5 derjenigen der Monoacyl-Phosphoglyceride.

In Versuch Nr. 3.7.2. konnte mittels Gaschromatographie gezeigt werden, daß das Enzympräparat LP_1 Lysophosphatidylcholin, das nur mit einer gesättigten Fettsäure verestert ist, bevorzugt gegenüber Lysophosphatidylcholin abbaut, das mit einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren verestert ist.

In Versuch Nr. 3.7.3. wurde die Substratspezifität des Enzympräparates unter Verwendung verschiedener Puffermedien untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß die Enzymaktivität in starkem Maße von der Zusammensetzung des Puffermediums abhängig ist.

Die Substratspezifität-Untersuchungen von LP_1 und LP_2 ergeben, daß es sich bei beiden Enzympräparaten um unspezifische Lysophospholipasen handelt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen von anderen Autoren überein. Die Lysophospholipase aus Rattenleber (54) greift nicht nur die mit einer Fettsäure veresterten LPC an, sondern auch die zweifach mit Fettsäuren veresterten PC. Die Untersuchungen von einer aus Rinderpankreas gereinigten Lysophospholipase (139) hat ergeben, daß der Wirkbereich dieses Enzyms nicht allein auf Lysophospholipide beschränkt ist, vielmehr besitzt das Enzym den Charakter von unspezifischen Carboxylesterasen.

Zur Bestimmung der Enzymkinetik wurde der Einfluß der Substratkonzentration auf die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion untersucht. Der reziproke Wert der Reaktionsgeschwindigkeit wurde entsprechend der Methode von Lineweaver und Burk (111) mit dem reziproken Wert der Substratkonzentration in Beziehung gesetzt. Durch diese Methode konnte die Michaelis-Konstante der Deacylierung der untersuchten Substrate

ermittelt werden. In Tabelle 16 sind diese Ergebnisse dargestellt.

Tab. 16 Die K_m-Werte der untersuchten Substrate

Verwendete Substrate (aus Sojabohnen)	K_m-Werte (mM)
Lysophosphatidylcholin	0,26
Lysophosphatidyläthanolamin	0,42
Phosphatidylcholin	1,11
Phosphatidyläthanolamin	1,32

Die Michaelis Konstante (K_m) ist ein Maß für die Substrat-Affinität des Enzyms. Aus einem niederigen K_m-Wert läßt sich eine höhere Substrataffinität des Enzyms folgern und umgekehrt. Tab. 16 zeigt, daß das Enzympräparat LP_1 unter den untersuchten Substraten die höchste Affinität zu Lysophosphatidylcholin aufweist und die niedrigste zu Phosphatidyläthanolamin.

In Versuch Nr. 3.7.4. zeigt das Enzympräparat LP_1 bei allen untersuchten Substraten die höchste enzymatische Aktivität bei einem pH-Wert von 7,5. Die Enzympräparation LP_2 arbeitet in einem breiteren pH-Bereich von pH 7,5 bis pH 8,0.

Das pH-Optimum vieler Lysophospholipasen aus tierischem Gewebe wurde im allgemeinen im neutralen Bereich gefunden. Ein pH-Wert von 6,0-7,0 wurde für die Lysophospholipasen aus Rinderpankreas (24,137), aus Rattendünn-

darm (55) und aus Rindernebennieren (51) ermittelt; ein pH-Wert von 8,0 wurde für die Enzyme aus Rattenhirn (49), Moskitolarve (42) und Hausfliege (41) gefunden.
Lysophospholipasen aus Mikroben besitzen einen optimalen pH-Bereich von pH 4,0 bis pH 9,0 (27-30).
Lysophospholipasen aus dem Gift zweier australischer Schlangen (140) zeigten die höchste Aktivität bei pH 7,0. Bei Skorpion-Gift lag der optimale Wert zwischen pH 8,0 und pH 11,0 (44).

Beide Enzyme aus LP_1 und LP_2 zeigen eine große Stabilität, besonders wenn sie in einer niedrigen Konzentration bei 4^oC aufbewahrt wurden (s. V. 3.7.6.). Bei höherer Konzentration bildet sich allmählich ein Niederschlag, wobei ein Teil der enzymatischen Aktivität verloren geht.

In den Versuchen 3.7.7. bewirkte Harnstoff eine irreversible Hemmung der Lysophospholipase-Aktivität von LP_1, die bereits bei 4 M Harnstoff stark ist, bei 6 M Harnstoff ist sie vollständig. In diesem Fall führte Harnstoff zu einer Denaturierung des Enzyms, die auch nach Entfernung des Harnstoffs durch 24-stündige Dialyse gegen physiologische NaCl/Phosphat-Lösung nicht mehr rückgängig zu machen ist.

Beide Enzyme aus LP_1 und LP_2 verlieren ihre Aktivitäten vollständig nach einer 30-minütigen Inkubation bei einer Temperatur von $55\text{-}60^oC$ (s. V. 3.7.8.). Lysophospholipasen sind im allgemeinen weniger hitzestabil als Phospholipasen. Viele Lysophospholipasen verlieren ihre Aktivitäten durch Erhitzen. Sowohl die Lysophospholipase aus Rinderleber (26,53), wie auch die Lysophospholipasen aus Rattendünndarm (25,55) und aus Penicillium notatum (141) verlieren durch Erwärmung auf 60^oC ihre Aktivitäten. Andererseits zeigen die Lysophospholipasen aus Vibrio El Tor (28) und aus Serratia plymuthicum (27) eine extreme Hitzebestän-

digkeit. Beide Enzyme bleiben auch nach kurzzeitigem Erhitzen auf 100°C noch aktiv.

Werden Lysophospholipasen unterschiedlichen Ursprungs mit verschiedenen Enzyminhibitoren behandelt, zeigen sie daraufhin unterschiedliches enzymatisches Verhalten.

Schwermetalle, insbesondere Quecksilber, hemmen die Aktivitäten aller Enzym-Präparate.

Die meisten Lysophospholipasen benötigen keine Kofaktoren. Von einigen Ausnahmen abgesehen, werden sie weder durch Ca^{2+}-Ionen aktiviert, noch durch EDTA gehemmt.

p-Clormercuribenzoat (PCMB) beeinflußt viele der beschriebenen Lysophospholipasen nicht (36). Einige jedoch werden teilweise (37,54), andere vollständig (55) von PCMB gehemmt.

Lysophospholipasen unterschiedlichen Ursprungs werden durch Diisopropylflurophosphat (DFP) unterschiedlich beeinflußt. Das Enzym aus Rattenleber wird durch DFP nicht verändert (26), während die Lysophospholipase aus Rinderpankreas durch 1 M DFP vollständig gehemmt wird (137).

Fettsäuren hemmen Lysophospholipasen aus Rattenleber nicht (54), aus Rattenhirn und Walfleisch nur teilweise (38,49).

Äther zeigt eine hemmende Wirkung auf die enzymatische Aktivität einiger Lysophospholipasen (26,140).

Wie Magee und Mitarb. (142) berichteten, wird die enzymatische Wirkung in vielen Säugetiergeweben durch Desoxycholat unterdrückt. Über die hemmende Wirkung auf die Enzyme durch Detergentien herrscht allgemein Übereinstimmung (25,49). Die Hemmung der enzymatischen Aktivität sowohl durch kationische, als auch durch anionische und neutrale Detergentien läßt vermuten, daß nicht das Enzym durch den Hemmstoff beeinflußt wird, sondern das Substrat. Möglicherweise werden Lysophospholipide in Mizellen

aus Detergentien eingebettet. Somit werden die Estergruppen für das Enzym unzugänglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einiger Metall-Ionen und Enzym-Hemmstoffe auf die enzymatischen Aktivitäten von LP_1 und LP_2 untersucht. Eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse ist in Tabelle 17 dargestellt.
Neben den in Tab. 17 angegebenen Substanzen wurde sowohl der Einfluß von Neuraminidase (Versuch Nr. 3.8.), als auch derjenige von einem Glukokortikoid (Versuch Nr. 3.9.) auf die enzymatische Aktivität von LP_1 untersucht.
Die Neuraminidase-Behandlung von LP_1 bewirkt eine geringe Hemmung der Enzymaktivität. Die Neuraminidase bewirkt möglicherweise eine Änderung der Oberflächenladung des Enzymmoleküls. Diese Ladungsänderung könnte dann die Enzym-Substrat-Wechselwirkung beeinflussen.

Das Glukokortikoid Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium bewirkt einen maximalen Enzymaktivitätsverlust von etwa 75% bei einer Konzentration von 0,1 mg/mg Enzymprotein. Diese Hemmung von LP_1 könnte über eine verminderte Bereitstellung von Arachidonsäure für die Prostaglandinsynthese von Bedeutung für die Regelung von Entzündungsprozessen sein.

Um herauszufinden, ob das Enzympräparat LP_1 nur auf Phospholipide bewirkt, die in flüssigem Medium gelöst sind, oder auch auf solche, die in biologischen Membranen eingebaut sind, wurden sowohl menschliche Erythrozyten, als auch Erythrozyten-Schatten mit dem Enzympräparat inkubiert. In keinem Fall konnte eine signifikante Freisetzung von Fettsäuren beobachtet werden.

Tab. 17 Wirkung einiger Metall-Ionen und Enzym-Inhibitoren auf die Enzymaktivitäten von LP_1 und LP_2

zuges. Substanzen	Konzentration	enzymatische Aktivität (%) LP_1	LP_2
Ohne	-	100	100
Ca^{2+}	10 mM	127	98
Ca^{2+}	20 mM	138	97
Mg^{2+}	10 mM	86	100
Mg^{2+}	20 mM	80	100
EDTA	1 mM	60	74
EDTA	5 mM	0	34
Hg^{2+}	0,5 mM	12	-
Hg^{2+}	1,0 mM	0	0
Cu^{2+}	0,5 mM	45	-
Cu^{2+}	1,0 mM	32	-
NaCl	0,5 M	77	96
NaCl	1,0 M	67	84
NaF	50 mM	24	-
NaF	100 mM	32	-
NaN_3	50 mM	26	-
NaN_3	100 mM	14	-
Äther	5% (v/v)	102	70
Methanol	5% (v/v)	72	-
Äthanol	5% (v/v)	47	-
Butanol	5% (v/v)	10	-
DOC	1 mg/Ansatz	0	44
SDS	1 mg/Ansatz	36	-
PCMB	0,2 mM	72	100
PCMB	1,0 mM	50	100
DFP	0,5 mM	26	56
DFP	1,0 mM	0	4
Albumin	0,5 uM	100	-
Palmitinsäure	0,1 uM	101	-
Ölsäure	0,1 uM	99	-
Ölsäure	2,0 uM	95	-

5. Zusammenfassung

Der Abbau von Phospholipiden besteht aus der schrittweisen Deacylierung mit der Bildung von Lysophosphoglyceriden als Zwischenstufen.
Ein Ansteigen der Lysophosphatidylcholin-Konzentration in Körperflüssigkeiten und an Membranen stört die Stabilität vieler biologischer Membranstrukturen. Deshalb sind die Lysophospholipasen von großer Bedeutung für die Erhaltung der Membranintegrität und -stabilität.

Aus menschlichem Serum wurden zwei verschiedene Enzyme nachgewiesen, die Lysophosphatidylcholin abbauen. Eine dieser Lysophospholipasen (LP_1) - aus der Gruppe der γ-Globuline - konnte mittels Anionenaustauschchromatographie und Affinitätschromatographie 3000-fach angereichert werden. Die zweite Lysophospholipase (LP_2), welche mit der Coeruloplasminfraktion des Serums wandert, wurde nur 200-fach mit einer Ausbeute von 15% angereichert.

Die Lysophospholipase LP_1 wurde aus Humanserum mittels Ultrazentrifugation, Ammoniumsulfatfällung und anschließender Säulenchromatographie mit DEAE-Sephadex-A-50 gewonnen.

Die Anreicherung dieses Enzyms wurde durch Concanavalin-A-Sepharose-Säulen, Protein A-Säulen und Immunadsorptionssäulen durchgeführt.

Die Reinheit des Präparates wurde mittels isoelektrischer Fokussierung geprüft. Der isoelektrische Punkt von LP_1 liegt bei pH 5,5.

Das durch Gelfiltration mit Sephadex-G-200 bestimmte Molekulargewicht des Enzympräparates LP_1 beträgt 135 000.

Die Überprüfung der Substratspezifität der Lysophospholipasen LP_1 und LP_2 hat ergeben, daß das Wirkspektrum dieser Enzympräparationen nicht nur Lysophospholipase-Aktivität, sondern auch Phospholipase-Aktivität umfaßt. Beide Enzyme aus LP_1 und LP_2 können sowohl die Lysophosphatide Lysophosphatidylcholin (LPC) und Lysophosphatidylätanolamin (LPE), als auch die Phosphatide Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidyläthanolamin (PE) deacylieren.

Die K_m-Werte der untersuchten Substrate wurden graphisch aus den Daten über den Einfluß der Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt. Dabei zeigte das Enzympräparat LP_1 die höchste Affinität zu LPC und die niedrigste zu PE.

Mittels Gas-Flüssig-Chromatographie konnte gezeigt werden, daß das Enzympräparat LP_1 bevorzugt Lysophosphatidylcholin abbaut, das nur mit einer gesättigten Fettsäure verestert ist, im Gegensatz zu Lysophosphatidylcholin, das mit einer einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäure verestert ist.

Bei der Untersuchung der Substratspezifität von LP_1 unter Verwendung verschiedener Puffermedien ergab sich, daß die Enzymaktivität in starkem Maße von der Zusammensetzung des Puffermediums abhängig ist.

Das Enzympräparat LP_1 zeigt bei allen untersuchten Substraten die höchste Aktivität bei einem pH-Wert von 7,5, während LP_2 in einem breiteren pH-Bereich von pH 7,5 bis pH 8,0 arbeitet.

Beide Enzyme aus LP_1 und LP_2 verlieren ihre Aktivitäten vollständig nach Erwärmen auf 55-60^{o}C für 30 Minuten.

Die Wirkung einiger Metall-Ionen und Enzym-Hemmstoffe auf die enzymatischen Aktivitäten von LP_1 und LP_2 wurde untersucht.

Das Enzympräparat LP_1 benötigt Ca^{2+} zur Entfaltung seiner optimalen Aktivität. Diese Wirkung kann nicht durch Mg^{2+} ersetzt werden.
Eine vollständige Hemmung des Enzyms wird sowohl durch EDTA (10 mM) als auch durch Hg^{2+} (1 mM) erreicht. In unterschiedlichem Maße wird die Enzymaktivität weiterhin durch Cu^{2+}, NaCl, NaF und NaN_3 gehemmt.

Sowohl organische Lösungsmittel wie z.B. Methanol, Äthanol und Butanol als auch die Detergentien Desoxycholat (DOC) und Dedocylsulfat (SDS) verringern die enzymatische Aktivität stark.

p-Chlomercuribenzoat (PCMB) in einer Konzentration von 0.5 mM hemmt die Enzymaktivität von LP_1 höchstens zu 50%, während LP_2 unbeeinflußt bleibt.

Die Enzymaktivität wird durch Zugabe von Albumin oder Palmitinsäure zum Inkubationsmedium nicht verändert, während Ölsäure (2 µM) zu einem geringen Aktivitätsverlust führt.

Die enzymatische Aktivität wird durch Vorinkubation des Enzyms mit dem Glukokortikoid Prednisolon-21-hemisuccinat-Natrium stark gehemmt.
Ein maximaler Aktivitätsverlust wird bei einer Konzentration des Glukokortikoids von 0.1 mg / mg Enzymprotein erreicht. Bei höheren oder niedrigeren Konzentrationen wird die Aktivität weniger stark beeinträchtigt.

Die Inkubation von LP_1 sowohl mit intakten Erythrozyten als auch mit Erythrozyten-Schatten ergab, daß das Enzym membrangebundene Phospholipide nicht angreift.

6. Literaturverzeichnis

1. Contardi, A. und Ercoli, A.:
   Biochem. Z. 261, 275 (1933)

2. De Haas, G.H., Postema, N.M., Nienwenhuizen, W. und van Deenen, L.L.M:
   Biochim. Biophys. Acta 159, 103 (1968)

3. Wells, M.A. und Hanahan, D.J.:
   Biochemistry 8, 414 (1969)

4. Mebs, D.:
   Int. J. Biochem. 1, 335 (1970)

5. Hachimori, Y., Wells, M.A. und Hanahan, D.J.:
   Biochemistry 10, 4084 (1971)

6. Coles, E., Mcilwain, D.L. und Rapport, M.M.:
   Biochim. Biophys. Acta 337, 68 (1974)

7. Habermann, E. und Reiz, K.-G.:
   Biochem. Z. 341, 451 (1965)

8. Habermann, E.:
   Science 177, 314 (1972)

9. Kurup, P.A.:
   Naturwissenschaften 52, 478 (1965)

10. De Haas, G.H., Postema, N.M., Nienwenhuizen, W. und van Deenen, L.L.M.:
    Biochim. Biophys. Acta 159, 118 (1968)

11. Wittich, K.-A. und Schmidt, H.:
    Enzym. biol. clin. 10, 477 (1969)

12. Figarella, C., Clemente, F. und Gay, O.:
    Biochim. Biophys. Acta 227, 213 (1971)

13. Van Wezel, F.M. und De Haas, G.H.:
    Biochim. Biophys. Acta 410, 299 (1975)

14. Gallai-Hatchard, J.J. und Thompson, R.H.S.:
    Biochim. Biophys. Acta 98, 128 (1965)

15. Waite, M. und Sisson, P.:
Biochemistry 10, 2377 (1971)

16. Rahman, Y.E., Cerny, E.A. und Peraino, C.:
Biochim. Biophys. Acta 321, 526 (1973)

17. Bitran, M., Wald, R., Raysant, M. und Polonovsky, J.:
C.R. Soc. Biol. 165, 1847 (1971)

18. Patriarca, P., Beckerdite, S. und Elsbach, P.:
Biochim. Biophys. Acta 260, 593 (1972)

19. Gatt, S.:
Biochim. Biophys. Acta 159, 304 (1968)

20. Waite, M., Scherphof, G.L., Boshouwers, F.G. und van Deenen, L.L.M.:
J. Lipid Res. 10, 411 (1969)

21. Franson, R., Waite, M. und Weglicki, W.:
Biochemistry 11, 472 (1972)

22. Albright, F.R., White, D.A. und Lennarz, W.T.:
J. Biol. Chem. 248, 3968 (1973)

23. Brockerhoff, H. und Jensen, R.G.:
"Lipolytic Enzymes", Academic Press, New York (1974)

24. Shapiro, B.:
Biochem. J. 53, 663 (1953)

25. Epstein, B. uns Shapiro, B.:
Biochem. J. 71, 615 (1959)

26. Dawson, R.M.C.:
Biochem. J. 64, 192 (1956)

27. Hayaishi, O. und Kornberg, A.:
J. Biol. Chem. 206, 647 (1954)

28. Chatterjee, G.C. und Mitra, S.:
Biochem. J. 83, 384 (1962)

29. Oi, S. und Satomura, Y.:
Agr. Biol. Chem. 27, 397 (1963)

30. Oi, S. und Satomura, Y.:
Agr. Biol. Chem. 27, 405 (1963)

31. Proulx, P. und van Deenen, L.L.M.:
Biochim. Biophys. Acta 144, 171 (1967)

32. Okuyama, H. und Nojima, S.:
J. Biochem. (Tokyo) 57, 529 (1965)

33. Van den Bosch, H., van der Elzen, H.M. und van Deenen, L.L.M.:
Lipids 2, 279 (1967)

34. Ono, Y. und Nojima, S.:
Biochim. Biophys. Acta 176, 111 (1969)

35. Thompson, G.A., Jr.:
J. Protozool. 16, 397 (1969)

36. Ferber, E., Munder, P.G., Fischer, H. und Gerisch, G.:
Eur. J. Biochem. 14,253 (1970)

37. Van Golde, L.M.G., McElhaney, R.N. und van Deenen, L.L.M.:
Biochim. Biophys. Acta 231, 245 (1971)

38. Yur Kowski, M. und Brockerhoff, H.:
J. Fish. Res. Bd. Can. 22, 643 (1965)

39. Cohen, H., Hamosh, M., Atia, R. und Shapiro, B.:
J. Food Sci. 32, 179 (1967)

40. Mulder, E., van den Berg, J.W.O. und van Deenen, L.L.M.:
Biochim. Biophys. Acta 106, 118 (1965)

41. Khan, M.A.Q. und Hodgson, E.:
Comp. Biochem. Physiol. 23, 899 (1967)

42. Hanumantha Rao, H. und Subrahmanyam, D.:
J. Lipd Res. 10, 636 (1969)

43. Kumar, S.S., Millay, R.H. und Bieber, L.L.:
Biochemistry 9, 754 (1970)

44. Mohamed, A.H., Kamel, A. und Ayobe, M.H.:
Toxicon 6, 293 (1969)

45. Shiloah, J., Klibansky, C., de Vries, A. und Berger, A.:
J. Lipid Res. 14, 267 (1973)

46. Marples, E.A. und Thompson, R.H.S.:
J. Biol. Chem. 74, 123 (1960)

47. Shibko, S. und Tappel, A.L.:
Arch. Biochem. Biophys. 106, 259 (1964)

48. Stoffel, W. und Greten, H.:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1145 (1967)

49. Leibovitz, Z. und Gatt, S.:
Biochim. Biophys. Acta 164, 439 (1968)

50. Weglicki, W.B., Waite, M., Sisson, P. und Shohet, S.B.:
Biochim. Biophys. Acta 231, 512 (1971)

51. Hörtnagl, H., Winkler, H. und Hörtnagl, H.:
Eur. J. Biochem. 10, 243 (1969)

52. Lands, W.E.M.:
J. Biol. Chem. 235, 2233 (1960)

53. Waite, M. und van Deenen, L.L.M.:
Biochim. Biophys. Acta 137, 498 (1967)

54. Van den Bosch, H., Aarsman, A.J., Slotboom, A.-J. und van Deenen, L.L.M.:
Biochim. Biophys. Acta 164, 215 (1968)

55. Subbaiah, P.V. und Ganguly, J.:
Biochem. J. 118, 233 (1970)

56. Glomset, J.A., Janssen, E.T., Kennedy, R. und Dobbins, J.:
J. Lipid Res. 7, 639 (1966)

57. Bergenhem, B. und Fåhraeus, R.:
Z. ges. exp. Med. 97, 535 (1936)

58. Schiebel, W. und Ruhenstroth-Bauer, G.:
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 27 (1967)

59. Adlkofer, F., Ketnath, H.-J., Uher, L. und Ruhenstroth-Bauer, G.:
Blut 19, 321 (1969)

60. Ruhenstroth-Bauer, G.:
Hippokrates 21, 829 (1961)

61. Groß, R., Gerhard, W. und Rassner, G.:
Dtsch. med. Wschr. 91, 1869 (1966)

62. Scherer, R. und Ruhenstroth-Bauer, G.:
Klin. Wschr. 52, 208 (1974)

63. Piper, W., Obladen, M. und Zöller, M.:
Dtsch. med. Wschr. 94, 605 (1969)

64. Berlin, R., Böttiger, L.E. und Vikrot, O.::
Acta med. scand. 194, 371 (1973)

65. Hubmann, F.-H.:
Inaugural-Dissertation, München (1972)

66. De Lalla, O.F. und Gofman, J.W.:
Methods Biochem. Analysis 1, 459 (1954)

67. Korn, E.D.:
Methods Biochem. Analysis 7, 145 (1959)

68. Lindgreen, F.T., Nichols, A.V. und Putman, F.W.:
"Plasma Proteins", Bd. II, S. 4, Academic Press,
New York (1960)

69. Havel, J.R., Eider, H.A. und Bragdon, J.H.:
J. Clin. Invest. 34, 1345 (1955)

70. Taylor, J.F. und Neurath, H.N.:
The Proteins I., 55 (1953)

71. Schiebel, W., Nass, G., Eulitz, M. und Ruhenstroth-Bauer, G.:
Hoppe-Seyler's Z. für Physiol. Chem. 338, 198 (1964)

72. Gelotte, B., Flodin, P. und Killander, J.:
Arch. Biochem. Biophys., Suppl. 1, 319 (1962)

73. Fahey, J.L. und Terry, E.W.:
"Ion Exchange Chromatography and Gel Filtration",
Handbook of Experimental immunology, 2. Edition,
Blackwell Scientific Publications, Oxford (1973)

74. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Schweden:
Sephadex-Ionenaustauscher, Leitfaden zur Ionenaustauschchrom.

75. Amicon Corporation Scientific Division:
Operating Instructions, Oosterhout, N.B., Holland

76. Pharmacia Fine Chemicals:
Affinity Chromatography, Principles and Methods,
Uppsala, Schweden (1976)

77. Pharmacia Fine Chemicals:
CNBr-activated Sepharose 4B, Con A-Sepharose,
Uppsala, Schweden.

78. Asperg, K. und Porath, J.:
Acta Chem. Scand. 24, 1839 (1970)

79. Lloyd, K.O.:
Arch. Biochim. Biophys. 137, 460 (1970)

80. Pharmacia Fine Chemicals:
Protein A, Protein A-Sepharose CL-4B, Uppsala,
Schweden.

81. Pharmacia Fine Chemicals:
Separation News, Uppsala, Schweden (1974)

82. Kristiansen, T.:
Biochim. Biophys. Acta 362, 567 (1974)

83. Sjöholm, I.:
FEBS Lett. 52, 53 (1975)

84. Frommel, D., Dupuy, J.M., Litman, G.W. und Good, R.A.:
J. Immunol. 105, 1292 (1970)

85. Pharmacia Fine Chemicals:
Activated Thiol-Sepharose 4B for Covalent Chromatography, Uppsala, Schweden (1974)

86. Jander-Wendt:
"Analytische und präparative anorganische Chemie" s. 69 (1954)

87. Lang, C.A.:
Anal. Chem. 30, 1692 (1958)

88. Schwick, H.G., Störiko, K. und Becker, W.:
Laboratoriumshefte für die med. Diagnostik, Behringwerke AG, Nr. 3 (1971)

89. Ouchterlony, Ö.:
Arkiv. Kemi. Mineral. Geol. 26 B, 1 (1948)

90. Wagner, H., Hölzl, J. Schmid, A. und Hörhammer, L.:
Naturwissenschaften 50, 230 (1963)

91. Hölzl, J., Chatterjee, M. und Hörhammer, L.:
Biochem. Z. 340, 400 (1964)

92. Hölzl, J. und Wagner, H.:
J. Lipid Res. 7, 569 (1966)

93. Hölzl, J.:
Z. Anal. Chem. 252, 137 (1970)

94. Hölzl, J. und Wagner, H.:
Z. Naturforschung 26 b, 425 (1971)

95. Rhodes, D,N. und Lea, C.H.:
Biochem. J. 65, 526 (1957)

96. Rouser, G., Kritchevsky, G., Heller, D. und Lieber, E.:
J. Am. Oil Chem. Soc. 40, 425 (1963)

97. Klenk, E., Debuch, H., Eikermann, H. und Lappe, G.:
United States Patent Office 3031, 478 (1962)

98. Brandt, A.E. und Lands, W.E.M.:
Biochim. Biophys. Acta 144, 605 (1967)

99. Stahl, E.:
"Dünnschichtchromatographie", ein Laboratoriums-handbuch, 2. Auflage, Springer-Verlag (1967)

100. Zahler, P.:
Z. f. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 5, 191 (1967)

101. Fiske, Ch.H. und Subbarow, Y.:
J. Biol. Chem. 66, 375 (1925)

102. Bartlett, G.R.:
J. Biol. Chem. 234, 466 (1959)

103. Dawson, R.M.C.:
Biochem. J. 75, 45 (1960)

104. Dole, V.P. und Meinertz, H.:
J. Biol. Chem. 235, 2595 (1960)

105. Thenot, J.P. und Hornig, E.C.:
Analytical Letters 5(4), 217 (1972)

106. Habermann, E., Bandtlow, G. und Krusche, B.:
Klin. Wschr. 39, 816 (1961)

107. Zöllner, N. und Eberhager, D.:
"Untersuchung und Bestimmung der Lipoide im Blut",
Springer-Verlag, Berlin (1965)

108. Andrews, P.:
Biochem. J. 91, 222 (1964)

109. Bours, J.:
Science Tools, 20, 29 (1973)

110. Scherer, R., Huber-Friedberg, W., Salem, A. und Ruhenstroth-Bauer, G.:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 897 (1976)

111. Lineweaver, H. und Burk, D.:
J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934)

112. Dodge, J.T., Mitchell, C. und Hanahan, D.J.:
Arch. Biochem. Biophys. 100, 119 (1963)

113. Glomset, J.A.:
J. Lipid Res. 9, 155 (1968)

114. Collier, H.B. und Chen, H.L.:
Can. J. Research E 28, 289 (1950)

115. Saunders, L.:
J. Pharm. Pharmacol. 9, 834 (1957)

116. Thomas, J.L. und Saunders, L.:
J. Pharm. Pharmacal., Suppl. 10, 182 T. (1958)

117. Lucy, J.A.:
Nature 227, 815 (1970)

118. Klibansky, C. und De Vries, A:
Biochim. Biophys. Acta 70, 176 (1963)

119. Greig, M.E. und Gibbons, A.J.:
Arch. Biochem. Biophys. 61, 343 (1956)

120. Mann, Th.:
"The Biochemistry of Seman and of the Male Reproductive Tract", London, Methnen Ca. Ltd. (1964)

121. Mehrishi, J.N., Cater, D.B. und Hartveit, F.:
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 74, 141 (1968)

122. Collier, H.B.:
Fed. Proc. 6, 245 (1947)

123. Kates, M., Allison, A.C. und James, A.T.:
Biochim. Biophys. Acta 48, 571 (1961)

124. Ruhenstroth-Bauer, G.:
Klin. Wochenschrift 44, 533 (1966)

125. Keller, R.:
Helvet. Physiol. Acta 22, C 24 (1964)

126. Middleton, E. und Phillips, G.B.:
J. Lab. Clin. Med. 64, 889 (1964)

127. Kirschmann, Ch., Aloof, S. und de Vries, A.:
Thromb. Diath. Haemorrh. 9, 512 (1963)

128. Klibansky, C. und de Vries, A.:
B B A 70, 176 (1963)

129. Berlin, R., Oldfelt, C.O. und Vikrot, O.:
Acta med. Scand. 185, 433 (1969)

130. Besterman, E.M.M. und Gillett, M.P.T.:
Atherosclerosis 14, 322 (1971)

131. Besterman, E.M.M. und Gillett, M.P.T.:
Atherosclerosis 16, 89 (1973)

132. Oliveira, M.M. und Vaughan, M.:
Fed. Proc. 21, 296 (1964)

133. Robertson, A.F. und Lands, W.E.M.:
J. Lipid Res. 5, 88 (1964)

134. Van Deenen, L.L.M., De Gier, J. und Mulder, E.:
Biochim. Biophys. Acta (Amsterdam) 70, 94 (1963)

135. Scherer, R., Salem, A., Huber-Friedberg, W. und Ruhenstroth-Bauer, G:
Profides of the Biological Fluido, Ed. by H. Pecters
Vol. 25, Pergamon Press, Oxford, New York, 247 (1978)

136. Chatterjee, G.C. und Das, S.K.:
Enzymologia 28, 346 (1965)

137. Van den Bosch, H., Aarsman, A.J., de Jong, J.G.N. und van Deenen, L.L.M.:
Biochim. Biophys. Acta 296, 94 (1973)

138. Kawasaki, N. und Saito, K.:
Biochim. Biophys. Acta 296, 426 (1973)

139. De Jong, J.G.N., van den Bosch, H. Aarsman, A.J. und van Deenen, L.L.M.:
Biochim. Biophys. Acta 296, 105 (1973)

140. Doery, H.M. und Pearson, J.E.:
Biochem. J. 92, 599 (1964)

141. Noguchi, S.:
J. Biochem. (Tokyo) 36, 113 (1944)

142. Magee, W.L., Gallai-Hatchard, J., Sanders, H. und Thompson, R.H.S.:
Biochem. J. 83, 17 (1962).

Lebenslauf

Am 13. September 1947 wurde ich als Sohn des Architekten Mohamed Salem und dessen Ehefrau Tahia Ali in Kairo geboren. Von 1951 bis 1963 besuchte ich die Volks- und Oberschule in Kairo, wo ich im Juni 1963 das Abitur bestand. Danach immatrikulierte ich mich in der Naturwissenschaftlichen Fakultät an der Ain Shams Universität in Kairo für das Studium der Chemie und Biochemie. Den Universitätskurs von 8 Semestern schloß ich im Juni 1967 mit dem Bacholar of Science (B.Sc.) ab.

Im Oktober 1967 wurde ich als Assistent im Fachbereich Biochemie an der Ain Shams Universität angestellt.

Im Oktober 1968 schrieb ich mich für den akademischen Grad des Master of Science (M.Sc.) ein. Meine Studien schloß ich 1971 ab und bewarb mich um eine Doktorarbeit für Biochemie. Nach 2 Jahren weiterer Studien an der Ain Shams Universität in Kairo erhielt ich 1973 ein DAAD-Stipendium.

Vom Oktober 1973 bis Februar 1974 erlernte ich die deutsche Sprache am Goethe-Institut in Freiburg.

Am 15. Januar 1978 heiratete ich Frl. Azza Elsady, Ärztin. Von März 1975 bis März 1979 arbeitete ich am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München in der Abteilung für Experimentelle Medizin unter der Leitung von Prof. Dr.Dr. G. Ruhenstroth-Bauer an der vorliegenden Dissertation.